



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년03월15일
(11) 등록번호 10-2228324
(24) 등록일자 2021년03월10일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/445 (2006.01) A61K 39/002 (2006.01)
A61K 39/012 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 14/445 (2013.01)
A61K 39/002 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2015-7024664
- (22) 출원일자(국제) 2014년02월14일
심사청구일자 2019년02월13일
- (85) 번역문제출일자 2015년09월09일
- (65) 공개번호 10-2015-0119110
- (43) 공개일자 2015년10월23일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2014/016359
- (87) 국제공개번호 WO 2014/127185
국제공개일자 2014년08월21일
- (30) 우선권주장
61/764,681 2013년02월14일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
JP2008538506 A
WO2011091255 A1

- (73) 특허권자
더 보드 오브 트러스티스 오브 더 유니버시티 오브 아칸소
미국 72207 아칸소주 리틀 락 노쓰 유니버시티 애비뉴 2404
더 텍사스 에이 & 엠 유니버시티 시스템
미국 77843-3369 텍사스주 칼리지 스테이션 티에이엠유 3369
- (72) 발명자
바르타, 존, 알.
캐나다 엔1취 2더블유1 온타리오주 겔프 2119 스톤 로드 이스트 50 오브이씨피 알엠
베르그만, 루크
미국 77845 텍사스주 칼리지 스테이션 마틴스빌 레인 1207
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 36 항

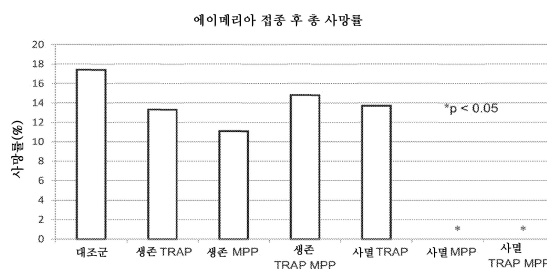
심사관 : 김정아

(54) 발명의 명칭 에이메리아에 대한 면역 반응을 증진시키거나, 에이메리아 감염을 제한하는 조성물 및 방법

(57) 요약

본원에서는 아피콤플렉산 기생충에 대한 면역 반응을 증진시키고, 후속 감염과 관련된 이환 또는 사망을 감소시키기 위한 백신 벡터, 및 백신 벡터를 사용하는 방법을 제공한다. 백신 벡터는 톱보이드 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하고, 임의적으로는 백신 벡터의 표면 상에서 적합하게 발현되는 면역자극성 폴리펩티드를 포함한다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 39/012 (2013.01)

(72) 발명자

비엘케, 리사

미국 72703 아칸소주 페이엇빌 오클랜드 지온 로드
3175

하기스, 빌리

미국 72703 아칸소주 페이엇빌 오클랜드 지온 로드
3229

쉬바라마이아, 스리차이탄야

인도 560102 카르나타카 방갈로르 섹터 7 에이취에
스알 레이아웃 크로스 23 메인 12 #515

포크너, 올리비아, 비.

미국 72730 아칸소주 파밍톤 리비에라 플레이스
12184

명세서

청구범위

청구항 1

임의적으로 백신 벡터의 표면 상에서 발현되는 아피콤플렉산(Apicomplexan) 롬보이드(Rhomboid) 폴리펩티드를 코딩하는 제1 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하며, 여기서 롬보이드 폴리펩티드는 서열 2 또는 서열 2의 아미노산 1-11, 18-27 또는 31-43을 포함하는 서열 2의 면역원성 단편에 대해 95% 초과 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드로 이루어진 것인 백신 벡터.

청구항 2

제1항에 있어서, 면역자극성 폴리펩티드를 코딩하는 제2 폴리뉴클레오티드 서열을 추가로 포함하고, 여기서 면역자극성 폴리펩티드는 백신 벡터의 표면 상에서 발현되는 것인 백신 벡터.

청구항 3

제2항에 있어서, 면역자극성 폴리펩티드가 HMGB1 폴리펩티드를 포함하는 것인 백신 벡터.

청구항 4

제3항에 있어서, HMGB1 폴리펩티드가 서열 15-23으로 이루어진 군으로부터 선택되는 폴리펩티드, 서열 15-23 중 하나 이상의 단편, 서열 15-23과 95% 이상의 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드, 및 그의 조합을 포함하는 것인 백신 벡터.

청구항 5

제2항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 면역자극성 폴리펩티드가 CD40에 결합할 수 있는 CD154 폴리펩티드를 포함하고, CD154 폴리펩티드는 50개 미만의 아미노산을 가지며, 서열 24, 서열 25 및 그의 상동체로 이루어진 군으로부터 선택되는 폴리펩티드의 아미노산 140-149를 포함하거나, 또는 서열 26, 서열 27, 서열 28, 서열 29, 서열 30으로 이루어진 군으로부터 선택되는 폴리펩티드 및 서열 26-30 중 하나 이상과 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드인 것인 백신 벡터.

청구항 6

제2항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 1 초과 카피수의 제1 폴리뉴클레오티드 및/또는 1 초과 카피수의 제2 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 백신 벡터.

청구항 7

제2항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 폴리뉴클레오티드 서열이 같은 리딩 프레임내에서 제2 폴리뉴클레오티드 서열에 연결되는 것인 백신 벡터.

청구항 8

제7항에 있어서, 제1 폴리뉴클레오티드 및 제2 폴리뉴클레오티드가 스페이서 뉴클레오티드 서열을 통해 연결되는 것인 백신 벡터.

청구항 9

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스, 박테리아, 효모 및 리포솜으로 이루어진 군으로부터 선택되는 백신 벡터.

청구항 10

제9항에 있어서, 바실루스 종(*Bacillus* spp.)인 백신 벡터.

청구항 11

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, TRAP 폴리펩티드를 코딩하는 제3 폴리뉴클레오티드를 추가로 포함하는 백신 벡터.

청구항 12

제11항에 있어서, TRAP 폴리펩티드가 서열 5, 서열 6, 서열 7, 서열 40, 서열 5의 면역원성 단편, 서열 6의 면역원성 단편, 서열 7의 면역원성 단편, 및 서열 40의 면역원성 단편과 95% 이상의 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드로 이루어진 균으로부터 선택되는 것인 백신 벡터.

청구항 13

제2항에 있어서, 제1 폴리뉴클레오티드 및 제2 폴리뉴클레오티드가 서열 32, 서열 34로 이루어진 균으로부터 선택되는 폴리펩티드, 및 서열 32 또는 서열 34와 95%의 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 것인 백신 벡터.

청구항 14

제1항 내지 제4항 및 제13항 중 어느 한 항의 백신 벡터, 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는, 비인간 대상체에서 아피콤플렉산 기생충에 대한 면역 반응을 증진시키기 위한 제약 조성물.

청구항 15

비인간 대상체에게 제1항 내지 제4항 및 제13항 중 어느 한 항의 백신 벡터를, 아피콤플렉산 기생충에 대한 대상체의 면역 반응을 증진시키는데 효과적인 양으로 투여하는 단계를 포함하는, 비인간 대상체에서 아피콤플렉산 기생충에 대한 면역 반응을 증진시키는 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 증진된 면역 반응이 증진된 항체 반응, 증진된 T 세포 반응, 또는 둘 다를 포함하는 것인 방법.

청구항 17

비인간 대상체에게 제1항 내지 제4항 및 제13항 중 어느 한 항의 백신 벡터를, 백신 벡터를 투여받지 않은 대조군 대상체와 비교하여 아피콤플렉산 기생충에 의한 대상체의 후속 감염과 관련된 이환을 감소시키는데 효과적인 양으로 투여하는 단계를 포함하는, 비인간 대상체에서 아피콤플렉산 기생충에 의한 감염과 관련된 이환을 감소시키는 방법.

청구항 18

제15항에 있어서, 백신 벡터가 경구, 점막, 비경구, 피하, 근육내, 안내 및 난대로 이루어진 균으로부터 선택되는 경로에 의해 투여되는 것인 방법.

청구항 19

제15항에 있어서, 비인간 대상체가 가금류 종, 또는 비인간 포유동물인 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 대상체가 돼지, 닭, 칠면조 및 소로 이루어진 균으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 21

제15항에 있어서, 약 10^4 내지 약 10^9 의 벡터 카피수의 백신을 비인간 대상체에게 투여하는 것인 방법.

청구항 22

제15항에 있어서, 백신 벡터가 대상체에게 투여되기 이전에 사멸화되거나, 또는 대상체에서 복제될 수 없는 것

인 방법.

청구항 23

제15항에 있어서, 아피콤플렉산 기생충이 에이메리아(*Eimeria*), 플라스모디움(*Plasmodium*), 톡소플라스마(*Toxoplasma*), 네오스포라(*Neospora*) 및 크립토스포리디움(*Cryptosporidium*)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 24

제17항에 있어서, 백신 벡터가 경구, 점막, 비경구, 피하, 근육내, 안내 및 난내로 이루어진 군으로부터 선택되는 경로에 의해 투여되는 것인 방법.

청구항 25

제17항에 있어서, 비인간 대상체가 가금류 중, 또는 비인간 포유동물인 방법.

청구항 26

제17항에 있어서, 백신 벡터가 대상체에게 투여되기 이전에 사멸화되거나, 또는 대상체에서 복제될 수 없는 것인 방법.

청구항 27

제17항에 있어서, 아피콤플렉산 기생충이 에이메리아, 플라스모디움, 톡소플라스마, 네오스포라 및 크립토스포리디움으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 28

제1항 내지 제4항 및 제13항 중 어느 한 항의 백신 벡터를 포함하는, 대상체에서 아피콤플렉산 기생충에 대한 면역 반응을 증진시키기 위한 의약.

청구항 29

제28항에 있어서, 백신 벡터가 경구적, 점막, 비경구적, 피하, 근육내, 안내 및 난내로 이루어진 군으로부터 선택되는 경로에 의한 투여용으로 제제화된 것인 의약.

청구항 30

제28항에 있어서, 약 10^4 내지 약 10^9 의 벡터 카피수의 백신 벡터를 대상체에게 투여하기 위해 제제화된 의약.

청구항 31

제28항에 있어서, 백신 벡터가 사멸화된 것이거나, 또는 복제될 수 없는 것인 의약.

청구항 32

제28항에 있어서, 백신 벡터가 에이메리아, 플라스모디움, 톡소플라스마, 네오스포라 및 크립토스포리디움으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아피콤플렉산 기생충에 특이적인 것인 의약.

청구항 33

제1항 내지 제4항 및 제13항 중 어느 한 항의 백신 벡터를 포함하는, 대상체에서 아피콤플렉산 기생충에 의한 감염과 관련된 이환을 감소시키기 위한 의약.

청구항 34

제33항에 있어서, 백신 벡터가 경구, 점막, 비경구, 피하, 근육내, 안내 및 난내로 이루어진 군으로부터 선택되는 경로에 의한 투여용으로 제제화된 것인 의약.

청구항 35

제33항에 있어서, 백신 벡터가 사멸화된 것이거나, 또는 복제될 수 없는 것인 의약.

청구항 36

제33항에 있어서, 백신 벡터가 에이메리아, 플라스모디움, 톡소플라스마, 네오스포라 및 크립토스포리디움으로 이루어진 균으로부터 선택되는 아피콤플렉산 기생충에 특이적인 것인 의약.

발명의 설명

기술 분야

[0001] **관련 출원에 대한 상호 참조**

[0002] 본 특허 출원은 2013년 2월 14일 출원된 미국 가특허 출원 번호 61/764,681의 우선권의 이점을 주장하며, 이 가특허 출원은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다.

[0003] **서열 목록**

[0004] 본 출원은 EFS-Web을 통해 전자 출원된 것이며, .txt 포맷의, 전자 제출된 서열 목록을 포함한다. .txt 파일은 2014년 2월 13일 작성된, 파일명 "2014-02-13 5658-00201...ST25.txt"의 서열 목록을 포함하며, 그 크기는 40.3 킬로바이트이다. 상기 .txt 파일에 포함되어 있는 서열 목록은 명세서의 일부이며, 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다.

배경 기술

[0005] 아피콤플렉산(apicomplexan) 원생동물 기생충 (에이메리아 종(*Eimeria spp.*), 및 관련 기생충)에 의해 유발된 가금류, 돼지, 및 소의 감염성 질환인 콕시디아증이 전 세계에 문제를 제시한다. 콕시디아증은 그가 가금류 산업에 대해 미치는 경제적인 영향 측면에서 상위 10위권 안에 드는 가금류의 감염성 질환 중 하나로서, 생산 손실은 매년 최대 20억 달러로 추정된다. 각각 말라리아, 크립토스포리디움증 및 톡소플라스마증의 원인 인자인 플라스모디움(*Plasmodium*), 크립토스포리디움(*Cryptosporidium*) 및 톡소플라스마(*Toxoplasma*)를 비롯한 다른 아피콤플렉산 기생충 또한 질환을 유발한다.

[0006] 콕시디아증의 전형적인 징후로는 빠른 식욕 감퇴, 체중 감소, 설사 및 극심한 사망을 포함한다. 무리에서의 집단발병은 고수준의 병원체에의 노출시에 발생하고, 해에 앓은 한 무리의 새의 경우, 콕시디아증은 조류를 2차 박테리아 감염에 취약하게 만든다. 전통적인 질환 방제 방법으로는 항생제 및 화학요법제를 투여하는 것을 포함한다. 그러나, 연속 사용시에는 저항성 문제를 일으켰다. 항생제 사용은 또한 가금육 사회적 수용을 감소시킨다. 백신화는 전형적으로는 시판용 닭의 전체 수명 동안 장기간에 걸쳐 방어를 부여할 수 있다는 그의 능력 때문에 합리적인 접근법이다.

[0007] 에이메리아에 대한 대부분의 상업적으로 이용가능한 백신은 조절된 저투여량의 본질적으로 완전하게 병독성이되, 약물 감수성인 에이메리아 기생충에 기반한다. 현 에이메리아에 기반 백신을 이용한 백신화는 백신화된 무리에서 상당한 백신-반응 이환 및 경제적 손실을 일으킨다. 따라서, 에이메리아에 대하여 효과적인, 병독성이 낮은 백신이 요구된다. 보존되는 면역원성 표적에 기반한, 에이메리아에 대하여 효과적인 백신은 또한 다른 아피콤플렉산 기생충에 대한 백신으로서 유용하다는 것이 입증될 수 있다.

발명의 내용

[0008] 본원에서 아피콤플렉산 롬보이드(Rhomboid) 폴리펩티드를 코딩하는 제1 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 백신 벡터, 및 상기를 사용하는 방법을 제공한다.

[0009] 한 측면에서, 아피콤플렉산 롬보이드 폴리펩티드 또는 그의 면역원성 단편을 코딩하는 제1 폴리뉴클레오티드, 및 면역자극성 폴리펩티드를 코딩하는 제2 폴리펩티드 서열을 포함하는 백신 벡터를 개시한다. 아피콤플렉산 롬보이드 폴리펩티드 및 면역자극성 폴리펩티드는 백신 벡터의 표면 상에서 적합하게 발현된다. 아피콤플렉산 롬보이드 폴리펩티드는 서열 1, 서열 2, 서열 3, 서열 4, 서열 37, 서열 38, 서열 1-4, 37-38 중 하나 이상의 면역원성 단편, 또는 서열 1-4 및 37-38의 조합을 포함할 수 있다. 면역자극성 폴리펩티드는 CD40 또는 HMGB1 폴리펩티드에 결합할 수 있는 CD154 폴리펩티드일 수 있다. CD154 폴리펩티드는 50개 미만의 아미노산을 포함하고, CD154 또는 그의 상동체의 아미노산 140-149를 포함한다.

- [0010] 또 다른 측면에서, 서열 1, 서열 2, 서열 3, 서열 4, 서열 37, 서열 38, 서열 1-4, 또는 37-38 중 하나 이상의 면역원성 단편, 또는 서열 1-4 또는 37-38의 조합의 아피콤플렉산 롬보이드 폴리펩티드를 코딩하는 제1 폴리뉴클레오티드를 포함하는 백신 벡터를 개시한다. 아피콤플렉산 롬보이드 폴리펩티드는 백신 벡터의 표면 상에서 발현될 수 있다.
- [0011] 본 발명에 따른 백신 벡터는 바이러스, 효모, 박테리아, 또는 리포솜 벡터일 수 있다. 제약 조성물은 본원에 기술된 백신 벡터 및 제약상 허용되는 담체로 구성될 수 있다.
- [0012] 추가의 또 다른 측면에서, 대상체에게 본원에 기술된 백신 벡터를 투여함으로써 대상체에서 아피콤플렉산 기생충에 대한 면역 반응을 증진시키는 방법을 제공한다. 증진된 면역 반응은 증진된 항체 반응, 증진된 T 세포 반응 또는 그의 조합일 수 있다.
- [0013] 추가의 다른 측면에서, 대상체에게 본원에 기술된 백신 벡터를 투여함으로써 대상체에서 아피콤플렉산 기생충에 의한 감염과 관련된 이환 및 사망을 감소시키는 방법을 제공한다. 백신 벡터는 대조군과 비교하여, 백신 벡터를 투여받은 대상체에서 아피콤플렉산 기생충에 의한 후속 감염과 관련된 이환 및 사망을 감소시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0014] 도 1은 수개의 아피콤플렉산 기생충 사이의 MPP 서열의 상동성을 보여주는 대표적인 개략도이다. 컨센서스 MPP 서열은 아피콤플렉산에서 아미노산 서열이 고도로 유사하다. 동일하지 않은 위치는, 도면 첫번째줄에 제시되어 있고, 서열 38인 컨센서스 서열에서 X로 표시되어 있다. 톡소플라스마 곤디이(*Toxoplasma gondii*) 서열 (컨센서스 아래의 처음 4개줄)은 에이메리아 막시마(*Eimeria maxima*)로부터의 서열 2의 MPP 서열과 100% 동일성을 공유한다. 하단의 두 서열은 각각 네오스포라 카니눔(*Neospora caninum*) (서열 3) 및 에이메리아 테넬라(*Eimeria tenella*) (서열 4)로부터의 상동체이다.
- 도 2는 본 실시예에 기술된 백신 벡터 구축물을 나타낸 개략도이다.
- 도 3은 명시된 서열을 발현하는 명시된 백신 벡터로 접종한 후, 에이메리아 막시마로 감염시킨 후 8일째의 닭의 체중 (그램)을 보여주는 막대 그래프이다. 처리군 사이의 유의적인 차이 ($p < 0.05$)는 다른 문자로 표시되어 있다.
- 도 4는 명시된 서열을 발현하는 명시된 백신 벡터로 접종한 후, 에이메리아 막시마로 접종 감염시킨 후 29일째의 생존한 닭의 체중 (그램)을 보여주는 막대 그래프이다. 처리군 사이의 유의적인 차이 ($p < 0.05$)는 실제 p 값 및 별표 (*)로 표시되어 있다.
- 도 5는 명시된 서열을 발현하는 명시된 백신 벡터로 접종한 후, 에이메리아 막시마로 접종 감염시킨 후 8일째의 에이메리아 막시마에 의한 병독성 접종 감염에도 불구하고 발생한 사망률(%)을 보여주는 막대 그래프이다. 처리군 사이의 유의적인 차이 ($p < 0.05$)는 별표 (*)로 표시되어 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0015] 콕시디아증에 대한 종래 백신은 일반적으로 제한된 개수로 전달되는 생 약독화된 기생충에 기반한다. 그러나, 기생충은 생존가능하고, 질환을 유발할 수 있는 바, 감염의 위험은 제거되지 않은 상태이다. 추가로, 이러한 유형의 백신은 살아있는 조류에 기생충을 접종하고, 그를 일정 간격으로 수집하고, 부화장에서 또는 농장에서 사용하기 위해 확실하게 생산으로부터 중단없이 냉장 수송 체인이 이루어지게 하는 것을 포함하는 바, 그의 제조 비용은 초고가이다. 백신화는 중요한 조절 방법인 바, 재조합 백신을 사용하는 것이 제조 비용을 절감시키면서, 콕시디아증 기반 백신의 전반적인 효능을 개선시킬 수 있다.
- [0016] 에이메리아 증은 고도로 면역원성이고, 강력한 숙주 면역 반응을 자극시킬 수 있다. 이러한 진핵 생물의 일부인 광범위한 항원 레퍼토리는 기능면에서 고도로 분화되어 있고, 재조합 백신 개발을 위해 적합한 표적이 된다. 포자소체 및 분열소체는 기생충 단계 중 운동성이 가장 큰 단계이며, 능동 감염을 개시하고 유지시키는 것을 담당한다. 상기 단계의 장 상피 세포 내로의 침입은 기생충이 숙주 세포 내에서 그의 생활환을 지속시키는데 필수적인 과정이다. 기생충의 앞쪽 단부 (정단)에 위치하는 고도로 분화된 세포 소기관 세트는 장 루멘으로부터 상피층 내로의 상기 운동성 단계의 전위를 위해 필요한 다수의 단백질 수송하는데 관여한다. 상기 정단 복합체는 운동성의 본질적인 기능을 지지하며 단백질 환경을 운동성을 띠는 아피콤플렉산 소체의 표면으로 수송하는 다수의 미세간상체를 비롯한, 다양한 분비형 세포 소기관으로 이루어진다.

- [0017] 잘 설명된 수개의 미세간상체 관련 단백질 중에서 트롬보스포닌 관련 부착 단백질 (TRAP)이 백신 후보물질로서 살모넬라(*Salmonella*) 재조합 및 바실루스(*Bacillus*) 벡터화된 시스템에서 성공적인 재조합 항원으로 사용되어 왔다. 미국 공개 번호 2011/0111015 (상기 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다)를 참조할 수 있다. 다수의 미세간상체 단백질은, 그가 숙주 세포에 도달하고, 기생충과, 그가 위에 존재하게 된다면 어느 것이든 모든 기질 사이의 링크로서의 역할을 하는 바, 포자소체의 앞쪽 단부에서 미세간상체 복합체로부터 유리된다는 점에서 작용 모드가 유사하다. 이어서, 미세간상체 단백질은 뒤쪽에서 기생충의 표면을 통과하여 전위되고, 이로써 기생충은 숙주 세포로 더욱 가깝게 이동하게 된다. 이러한 활주 형태의 운동성은 모든 아피콤플렉산 기생충에게 있어 전형적인 것이다. 미세간상체 단백질이 기생충의 뒤쪽 단부로 전위되었을 때, 침입 과정을 성공적으로 완료하기 위해서 이는 절단되고, 기생충의 표면으로부터 유리되어야 한다. 이러한 기능은 기생충 세포막 내에서 또는 그 세포막 상에서 구성적으로 발현되는 프로테아제 패밀리에 의해 수행된다. 절단 과정은 세포내에서 일어나고, 이는 감염을 전파하는데 절대적으로 요구된다.
- [0018] 재조합 백신 디자인을 위한 신규 접근법은 상기 프로테아제를 표적화하고, 절단/침입 과정을 방해하는 것을 포함한다. 절단 과정에 관여하는 프로테아제 패밀리는 롬보이드 프로테아제로 명명되고, 이는 에이메리아 및 다른 아피콤플렉사의 상동체와 함께 톡소플라스마 종에 매우 잘 기술되어 있다. 롬보이드 프로테아제 (ROM4 및 ROM5, MPP)는 미세간상체 단백질의 절단에 중심적으로 연루되어 있으며, 상이한 아피콤플렉산 기생충과 우수한 상동성을 공유한다. 본 발명자들의 가설은, 본 발명자들이 면역학적으로 프로테아제를 표적화할 수 있다면, 항체 결합은 절단 과정을 방해할 것이며, 이로써, 포자소체/분열소체의 운동성은 손상될 것이라는 전제에 기반한 것이었다. 감염이 성공적으로 이루어질 수 있도록 하기 위해서는 기생충의 세포내 발생이 필수적이고, 본 발명자들의 접근법은 세포 침입을 억제시킬 수 있고, 이로써 생활환 확립을 방해할 수 있다. MPP를 표적화하는 것의 장점은 다수의 아피콤플렉산 종들 간에 보존되는 상기 단백질의 성질을 통해 에이메리아 뿐만 아니라, 다른 아피콤플렉사에 대해서도 적합하게 표적화할 수 있다는 점이다.
- [0019] MPP (ROM5)의 예측 항원성 영역을 정렬하고, 6개의 상이한 아피콤플렉사 사이의 상동성에 대하여 체크하였다 (도 1). 비교된 7개의 서열은 하기와 같다: 에이메리아 테넬라(*Eimeria tenella*) ROM4 (JN558353), 톡소플라스마 곤다이 ME49 ROM5 (XP_002370238), 톡소플라스마 곤다이 ROM5 (AAT84606), 톡소플라스마 곤다이 ROM5 (AY587208), 톡소플라스마 곤다이 RH ROM5 (AM055942), 톡소플라스마 곤다이 (AY634626), 및 서열 2의 에이메리아 막시마로부터의 MPP 인서트. 적합한 아피콤플렉산 기생충으로는 에이메리아 테넬라, 에이메리아 막시마, 및 에이메리아 브루네티(*Eimeria brunetti*)를 포함하나, 이에 한정되지 않는 에이메리아 종; 톡소플라스마 곤다이; 네오스포라 카니눔(*Neospora caninum*); 크립토스포리디움 종; 및 플라스모디움 팔시파룸(*Plasmodium falciparum*), 플라스모디움 말라리아에(*Plasmodium malariae*), 플라스모디움 크노우레시(*Plasmodium knowlesi*), 및 플라스모디움 비박스(*Plasmodium vivax*)를 포함하나, 이에 한정되지 않는 플라스모디움 종을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0020] 재조합 DNA 기술을 통해 다수의 효모, 박테리아 및 바이러스 종을 상대적으로 쉽게 조작할 수 있다. 일부 미생물은 경미한 병원성을 띠거나, 비-병원성이지만, 강력한 면역 반응을 생성할 수 있다. 이러한 미생물이 벡터에서 재조합적으로 발현된 항원에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 관심의 대상이 되는 백신 벡터를 제조한다. 미생물에 의해 벡터화된 백신은 자연 감염을 모방할 수 있고, 강력하고, 장기간 지속되는 점막 면역 생성에 도움을 줄 수 있고, 제조 및 투여가 상대적으로 저렴할 수 있다. 추가로, 상기 벡터는 흔히 1 초과의 항원을 보유할 수 있고, 다중의 감염원에 대하여 방어할 수 있는 잠재능을 가질 수 있다.
- [0021] 한 측면에서, 서열 1-4, 37-38의 아피콤플렉산 롬보이드 폴리펩티드, 그의 면역원성 단편, 또는 그의 조합을 코딩하는 제1 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 백신 벡터를 제공한다. 또 다른 실시양태에서, 아피콤플렉산 롬보이드 폴리펩티드를 코딩하는 제1 폴리뉴클레오티드, 및 면역자극성 폴리펩티드를 코딩하는 제2 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있는 백신 벡터를 제공한다. 롬보이드 폴리펩티드 및 임의적인 면역자극성 폴리펩티드는 백신 벡터의 표면 상에서 발현된다. 롬보이드 폴리펩티드는 전장의 단백질 (서열 39) 또는 면역원성 단편, 예컨대, 서열 1-4 및 37-38로 제공되는 것을 포함할 수 있다. 예를 들어, 롬보이드 폴리펩티드는 서열 1, 서열 2, 서열 3, 서열 4, 서열 37, 서열 38, 또는 상기 서열 중 임의의 것의 면역원성 단편을 포함할 수 있거나, 본질적으로 그로 이루어질 수 있거나, 또는 그로 이루어질 수 있다. 상기 단편의 조합 또한 백신 벡터에서 사용될 수 있다. 백신 벡터는 서열 1-4 또는 37-38을 포함할 수 있다. 단일 백신 벡터는 또한 다중 카피수의 단일 단편을 포함할 수 있다.
- [0022] 롬보이드 폴리펩티드의 면역원성 단편은 5, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 16, 18 또는 20개 이상의 아미노산 길이이고, 본원에서 제공하는 서열 1-4 또는 37-38의 단편과 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의

동일성(%)을 갖는 서열일 수 있다. 이론으로 제한하지 않으면서, 본원에서 제공하는 백신 벡터는 기생충이 세포 내로 침입하는 것을 차단할 수 있는 항체 반응을 유도함으로써 에이메리아 감염과 관련된 이환 및 사망을 감소시키는 것으로 여겨진다. 통상의 기술자는 B 세포 에피토프가 흔히 자연상에서는 친수성이라는 것을 알고 있으며, 이러한 정보는 본원에서 제공하는 서열 1-4 및 37-38의 폴리펩티드에 대한 면역원성 단편을 생성하는데 사용될 수 있다. 서열 2의 친수성 플롯은 상기 펩티드의 3개의 친수성 부위, 및 서열 2의 아미노산 1-11, 18-27 및 31-43을 비롯한, 3개의 잠재적인 B 세포 에피토프를 나타낸다. 이러한 아미노산 단편은 서열 3 및 37의 아미노산 7-16 및 서열 4의 아미노산 12-21에 상응한다. 서열 1 및 38의 두 컨센서스 서열에 의해 제시된 바와 같이, 서열 2의 18-27에 상응하는 아미노산은 아피콤플렉산 기생충의 종 및 속 간에 고도로 보존된다. 상기 고도로 보존되는 에피토프에 대한 면역 반응을 통해 단일 백신으로부터 중간 또는 심지어는 속간 면역을 허용할 수 있다.

[0023] 백신은 폴리펩티드에 대한 면역 반응을 유도할 수 있는 항원성 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 임의의 조성물을 포함한다. 백신 벡터는 항원 또는 면역자극성 폴리펩티드를 보유하도록 조작될 수 있고, 이는 또한 애주번트를 포함할 수 있거나, 추가로 기생충에 대한 면역 반응을 증가시키고, 후속 감염과 관련된 이환 및 사망으로부터 더욱 잘 보호하기 위해 애주번트와 함께 투여될 수 있는 조성물이다. 에이메리아 또는 다른 아피콤플렉산 기생충, 예컨대, 플라스모디움 (말라리아의 원인 인자), 톡소플라스마 및 크립토스포리디움에 대한 백신화 및 면역 반응의 생성을 위한 벡터, 예컨대, 박테리아 벡터의 용도를 개시한다. 백신 벡터 투여 후 면역 반응은 완전하게 방어성일 필요는 없지만, 후속 감염과 관련된 이환율 및 사망률(%) (즉, 사망 가능성)을 감소시킬 수 있다

[0024] 서열 1-4, 37-38의 롬보이드 폴리펩티드 항원 또는 그의 단편, 및 임의의 다수의 병원성 유기체로부터의 다른 항원을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 벡터 내로 삽입될 수 있고, 벡터에서 발현될 수 있다. 대상체 면역화 이후에 상기 폴리뉴클레오티드를 벡터에 의해 발현시킴으로써 항원성 폴리펩티드를 생성할 수 있다. 폴리뉴클레오티드를 벡터의 염색체 내로 삽입할 수 있거나, 또는 플라스미드 또는 다른 염색체의 DNA 상에서 코딩할 수 있다. 통상의 기술자는 벡터, 예컨대, 살모넬라 또는 바실루스에서 폴리뉴클레오티드를 발현시키는 데에는 다수의 방법론이 존재한다는 것을 이해할 것이다. 통상의 기술자에게 공지된 방법에 의해 폴리뉴클레오티드를 프로모터 (예컨대, 구성적 프로모터, 유도성 프로모터 등)에 작동가능하게 연결시킬 수 있다. 적합하게, 롬보이드 항원을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 벡터, 예컨대, 박테리아 벡터 내로 삽입하고, 이로써 폴리뉴클레오티드는 발현된다.

[0025] 롬보이드 항원을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 프레임내에서 막횡단 단백질질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 삽입할 수 있다. 롬보이드 항원을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 벡터 폴리뉴클레오티드 서열 내로 삽입하여 롬보이드 항원이 벡터의 표면 상에서 발현될 수 있도록 한다. 예를 들어, 벡터 폴리뉴클레오티드 서열이 프레임내에 그대로 유지되도록 롬보이드 항원을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 프레임내에서 막횡단 단백질질의 외부 루프 영역을 코딩하는 영역 중의 벡터 폴리뉴클레오티드 내로 삽입할 수 있다. 한 실시양태에서, 롬보이드 폴리펩티드를 코딩하는 제1 폴리뉴클레오티드를 살모넬라의 *lamB* 유전자의 루프 9 내로 삽입할 수 있다.

[0026] 또 다른 실시양태에서, 제1 폴리뉴클레오티드를 막횡단 단백질이 아닌, 세포벽에 부착되는 단백질의 표면 노출된 단부 내로 또는 그 단부에 삽입한다. 단백질은 단백질 또는 액체 앵커(anchor)를 통해 세포벽에 고정 또는 부착되는 분비 단백질일 수 있다. 본 실시예에서, MPP (서열 2) 폴리펩티드는 바실루스 섭틸리스(*Bacillus subtilis*)의 피브로넥틴 결합 단백질 (FbpB)의 3' 단부에 삽입된다. 대안적으로, 롬보이드 항원을 코딩하는 제1 폴리뉴클레오티드는 분비 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 내로 삽입될 수 있다.

[0027] 롬보이드 항원을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 매우 다양한 벡터 폴리뉴클레오티드에 삽입될 수 있으며, 이로써, 롬보이드 항원을 발현할 수 있으며, 백신으로 처리된 대상체의 면역 세포에 롬보이드 항원을 제시할 수 있다는 것을 통상의 기술자는 이해할 것이다. 롬보이드 항원을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 단일 카피수로 또는 1 초과 카피수로 포함될 수 있다. 다중 카피수가 단일 위치에 또는 1 초과 위치에 삽입될 수 있다. 대안적으로, 다중 에피토프, 예컨대, 본원에서 서열 1-4 및 37-38로서 제공되는 롬보이드 항원의 조합 또는 상기 에피토프와 다른 아피콤플렉산 에피토프, 예컨대, TRAP 또는 다른 병원체로부터의 에피토프와의 조합이 동일한 또는 1 초과 위치에 벡터 내로 삽입될 수 있다.

[0028] 적합하게, 제1 폴리뉴클레오티드는 롬보이드 폴리펩티드의 일부, 전체 롬보이드 폴리펩티드 또는 롬보이드 폴리펩티드로부터의 1 초과 에피토프를 코딩한다. 단일 기생충 또는 병원체로부터 유래된 1 초과 폴리펩티드 또는 에피토프의 조합, 또는 관련된 병원체로부터의 에피토프의 조합이 구체적으로 고려된다. 폴리뉴클레오

티드는 벡터 내로 삽입될 수 있고, 이는 1 초과와 에피토프를 함유하는 융합 단백질로서 삽입될 수 있다. 본 실시예에서는 서열 2 및 15 (MPP-HMGB1) 또는 서열 2, 40 및 15 (MPP-TRAP-HMGB1)가 바실루스 벡터 내로 도입되었다. 적합하게, 벡터 내로 삽입된 롬보이드 폴리펩티드의 일부는 항원성 단편이다. 항원성 단편은 세포성 또는 체액성 면역 반응을 유도할 수 있거나, 또는 기생충에 의한 후속 감염과 관련된 이환 또는 사망을 감소시킬 수 있는 펩티드 또는 폴리펩티드이다.

[0029] 항원성 폴리펩티드 또는 에피토프는 면역원성인 임의의 폴리펩티드를 포함한다. 항원성 폴리펩티드는 병원체 관련된, 알레르겐 관련된, 종양 관련된 또는 질환 관련된 항원을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 병원체로는 바이러스, 기생충, 진균 및 박테리아 병원체 뿐만 아니라, 단백질 병원체, 예컨대, 프리온을 포함한다. 항원성 폴리펩티드는 전장의 단백질 또는 그의 일부일 수 있다. 많은 단백질의 면역계 인식은, 흔히 에피토프로도 지칭되는 상대적으로 적은 개수의 아미노산에 기초한다는 것이 잘 확립되었다. 에피토프의 길이는 단지 4-8개의 아미노산 길이일 수 있다. 따라서, 본원에 기술된 항원성 폴리펩티드는 전장의 단백질, 4개의 아미노산 길이의 에피토프 또는 상기 양 극단 사이의 임의의 일부일 수 있다. 사실상, 항원성 폴리펩티드는 단일 병원체 또는 단백질로부터의 1 초과와 에피토프를 포함할 수 있다. 항원성 폴리펩티드는 본원에서 제공하는 서열과 85%, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 동일성(%)을 가질 수 있다. 적합하게, 롬보이드 항원 또는 폴리펩티드의 항원성 단편은 전장의 단백질 서열의 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개 이상의 아미노산, 15개 이상의 아미노산, 또는 20개 이상의 아미노산일 수 있다.

[0030] 다중 카피수의 같은 에피토프, 또는 동일하거나, 또는 상이한 단백질로부터의 다중 에피토프가 백신 벡터에 포함될 수 있다. 단일 백신 벡터를 사용하여 다중 관련된 병원체를 표적화할 수 있도록 허용하기 위해 백신 벡터 중의 에피토프는 관련되어 있고, 상동성일 수 있다. 동일하거나, 또는 상이한 병원체 또는 질환으로부터의 수 개의 에피토프 또는 항원은 다중 항원에 대한 증진된 면역 반응을 생성하기 위해 조합하여 단일 백신 벡터로 투여될 수 있다는 것이 구상된다. 재조합 백신 벡터는 다중 병원성 미생물, 바이러스로부터의 항원 또는 종양 관련 항원을 코딩할 수 있다. 다중 항원을 발현하는 백신 벡터를 투여하는 것이 동시에 2가지 이상의 질환에 대하여 면역을 유도함으로써 단일 병원체의 다중 균주에 대하여 더욱 광범위한 방어를 제공할 수 있거나, 단일 병원체에 대해 더욱 강력한 면역 반응을 제공할 수 있다는 이점을 가진다.

[0031] 본 실시예에서는 MPP 항원 (서열 2)을 수개의 벡터에서 제2 항원성 폴리펩티드와 함께 공발현시켰다. 에이메리아 막시마로부터 유래된 고분자량의 무성 단계 항원 (EmTFP250)이 상기 원생동물 기생충으로 감염된 육종 암탉에 의해 생산된 모계 항체에 대한 표적이 되는 것으로 입증되었다. 항원의 아미노산 서열에 대한 분석을 통해 16개의 트롬보스폰딘 1형 반복부 및 31개의 표피 성장 인자-유사 칼슘 결합 도메인을 함유하는 TRAP (트롬보스폰딘 관련 익명 단백질) 패밀리의 신규한 구성원이 밝혀졌다. 미국 특허 공개 번호 2011/0111015를 참조할 수 있다. EmTFP250 또는 TRAP 또한 글루탐산 및 글리신 잔기가 풍부한 2개의 저 복잡성의 친수성 영역, 및 아피콤플렉산 미세간상체 단백질 내에서 고도로 보존되는, 기생충 활주 운동성과 관련된 막횡단 도메인/세포질 테일을 함유한다. 수개의 잠재적인 에피토프가 선택되었고, 이는 본원에서는 서열 5-8로 재현되는, 미국 특허 공개 번호 2011/0111015의 서열 1-3 및 11로 확인된다. 본원에서 제공하는 실시예에서는 서열 40을 사용하였고, 이는 또한 TRAP 항원으로 지칭된다. 서열 40 및 서열 6은 단일 아미노산만큼 차이가 난다. 서열 6의 6번 위치의 프롤린이 서열 40의 같은 위치 6번의 아르기닌으로 변이된 것이다. 더욱 우수한 항원을 제조하기 위한 목표로 에피토프의 가용성 및 친수성을 증가시키기 위해 상기와 같은 변이가 이루어졌다. 통상의 기술자는 본 발명의 범주 내에서 항원성을 개선시키기 위해 다른 단일 아미노산을 변이시킬 수 있다. 상기 항원의 보존되는 성질에 기인하여 벡터에 의한 이들 에피토프의 발현은 다중 아피콤플렉산 기생충에 대한 방어 면역을 유도할 수 있다. 2개의 상이한 항원성 폴리펩티드를 포함하는 백신 벡터의 투여는 더욱 강력한 면역 반응을 유도할 수 있다.

[0032] 단일 백신에 의해 이루어지는 1 초과와 병원체에 대한 면역 반응을 증진시키기 위하여 다른 병원체로부터의 항원성 폴리펩티드가 백신 벡터에 사용될 수 있다는 것을 통상의 기술자는 이해할 것이다. 다중 병원체에 대한 단일의 백신을 투여하는 것이 이로울 것이다. 인플루엔자(*Influenza*), 살모넬라(*Salmonella*), 캄필로박터(*Campylobacter*) 또는 다른 병원체와 함께 아피콤플렉산 기생충, 예컨대, 에이메리아에 대한 면역 반응을 유도할 수 있는 백신이 구상된다.

[0033] 예를 들어, 제2 항원성 폴리펩티드는 인플루엔자 폴리펩티드일 수 있다. 적합하게는 인플루엔자 H5N1 폴리펩티드 또는 인플루엔자 바이러스의 다중 균주와 관련된 폴리펩티드, 예컨대, 인플루엔자 M2 단백질의 폴리펩티드이다. M2e로 알려져 있는 인플루엔자 A 바이러스 M2 단백질의 엑토도메인은 바이러스의 표면으로부터 돌출되어 있다. M2 단백질의 M2e 부위는 약 24개의 아미노산을 함유한다. M2e 폴리펩티드는 인플루엔자 내에서는 한 단리물에서 그 다음 단리물 간에 거의 차이가 없다. 사실상, 1918년 유행성 독감 이래로 M2e 중 오직 몇몇의 천

연적으로 발생된 돌연변이만이 감염된 인간으로부터 단리되었다. 추가로, 조류 및 돼지 숙주로부터 단리된 인플루엔자 바이러스는 상이하지만, 여전히 보존되는 M2e 서열을 가지고 있다. 인간, 조류 및 돼지 숙주로부터 단리된 M2e 폴리펩티드 서열에 관한 리뷰를 위해, 문헌 [Liu et al., *Microbes and Infection* 7:171-177 (2005)] 및 [Reid et al., *J. Virol.* 76:10717-10723 (2002)] (상기 문헌은 각각 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다)을 참조할 수 있다. 적절하게, 전체 M2e 폴리펩티드는 백신 벡터 내로 삽입될 수 있거나, 또는 오직 일부분만이 사용될 수 있다. 8개의 아미노산 폴리펩티드 (아미노산 서열: EVETPIRN을 갖는 LM2, 서열 9 또는 아미노산 서열 EVETPTRN을 갖는 그의 변이체 M2eA, 서열 10)를 백신 벡터 내로 도입하였고, 이는 닭으로의 투여 후 항체 반응을 일으키는 것으로 입증되었다. 미국 공개 번호 2011/0027309 (상기 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다)을 참조할 수 있다.

[0034] 인플루엔자 A 백신 벡터에 포함시키는데 적합한 다른 에피토프로는 인플루엔자 A의 헤마글루티닌 (HA) 또는 핵 단백질 (NP)의 폴리펩티드를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 예를 들어, 서열 11, 서열 12, 서열 13 또는 서열 14의 펩티드는 백신 벡터에 포함될 수 있다. 상기 서열 중 임의의 것이 다른 병원체 또는 항원으로부터 유래된 에피토프를 비롯한, 임의의 다른 에피토프와 함께 조합하여 사용될 수 있다는 것을 통상의 기술자는 이해할 것이다.

[0035] 백신 벡터의 일부로서 포함된 면역자극성 분자는 잠재적으로 장기간 지속되는 방어에 중요한 면역계의 일부를 활성화시킬 수 있거나, 또는 애주번트 효과를 제공할 수 있다. 면역자극성 폴리펩티드는 순수한(naive) 또는 적응 면역 반응을 자극시킬 수 있는 폴리펩티드일 수 있다. 면역자극성 폴리펩티드는 천연적으로 백신 벡터와는 관련이 없고, 척추동물 면역계, 예컨대, 백신을 투여받게 될 대상체의 면역계와는 천연적으로 관련이 있는 폴리펩티드이다. 두 면역자극성 폴리펩티드, 즉, CD154 및 고이동성 그룹 박스 1 (HMGB1) 폴리펩티드가 본원에 기술되어 있지만, 다른 면역자극성 폴리펩티드가 사용될 수 있거나, 또는 대안적으로, 본원에 기술된 것과 조합하여 사용될 수 있다는 것을 통상의 기술자는 이해할 것이다.

[0036] 면역계를 유발하는데 관여하는 폴리펩티드를 코딩하는 추가의 폴리뉴클레오티드 또한 백신 벡터에 포함될 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 그의 자극성 효과에 대한 공지된 면역계 분자, 예컨대, 인터루킨, 종양 괴사 인자, 인터페론, 보체, 또는 면역 조절에 관여하는 또 다른 폴리뉴클레오티드를 코딩할 수 있다. 백신은 또한 면역 반응을 자극하는 것으로 알려져 있는 펩티드, 예컨대, 본원에 기술된 CD154 또는 HMGB1 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0037] HMGB1은 활성화된 대식세포 및 손상된 세포에 의해 분비되고, 선천성 면역 반응에 영향을 미치면서, 염증의 시토카인 매개인자로서의 역할을 한다. HMGB1 서열의 일부가 본 실시예에 기술된 백신 벡터에 포함되었다. HMGB1 (고이동성 그룹 박스 1) 단백질은 최초로 DNA 구조 및 안정성에 중요한 DNA 결합 단백질로서 확인되었다. 이는 서열 특이성 없이 DNA에 결합하는 편재하여 발현하는 핵 단백질이다. 단백질은 고도로 보존되고, 식물 내지 포유동물에서 발견된다. 제브라피시, 닭, 및 인간 HMGB1 아미노산 서열은 각각 서열 23, 서열 15 및 서열 22에 제공되어 있다. 포유동물 전체의 서열은 고도로 보존되며, 98%의 아미노산 동일성을 가지고, 아미노산 변이는 보존적이다. 따라서, 한 종으로부터의 HMGB1 단백질은 기능상 또 다른 종으로부터의 것 대신으로 치환될 수 있다. 전장의 HMGB1 단백질 또는 그의 일부가 본원에 기술된 백신 벡터에서 HMGB1 폴리펩티드로서 사용될 수 있다. HMGB1은 서열 16 및 17에 제시된 바와 같은 A 박스, 및 서열 18 및 19에 제시된 바와 같은 B 박스로 명명되는 2개의 DNA 결합 영역을 가진다. 문헌 [Andersson and Tracey, *Annu. Rev. Immunol.* 2011, 29:139-162] (상기 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다)을 참조할 수 있다.

[0038] HMGB1은 염증 매개인자이며, 예컨대, 괴사 세포로부터의 핵 손상 신호로서의 역할을 한다. HMGB1은 또한 단백질의 아세틸화, 핵 통과 전위, 및 분비를 필요로 하는 프로세스에서 단백질/대식세포 계통의 세포에 의해 활발하게 분비될 수 있다. 세포의 HMGB1은 최종 당화 생성물에 대한 수용체 (RAGE: Receptor for Advanced Glycated End-products), 및 톨(Toll)-유사 수용체 패밀리의 (TLR)의 구성원, 특히 TLR4를 통한 신호 전달에 의해 염증의 강력한 매개인자로서의 역할을 한다. RAGE 결합 활성이 확인되었고, 이는 서열 20의 폴리펩티드를 필요로 한다. TLR4 결합은 서열 15의 106번 위치의 시스테인을 필요로 하는데, 이는 HMGB1의 B 박스 영역에서 발견된다.

[0039] HMGB1의 염증성 활성은 전장의 단백질 및 기능성 단편의 확인을 필요로 하지 않는다. B 박스는 HMGB1의 염증유발성 효과를 매개하는데 충분한 것으로 밝혀져 있으며, 따라서, 서열 18 및 19는 본 발명의 맥락 내에서 HMGB1 폴리펩티드 또는 그의 기능성 단편이다. 추가로, RAGE 결합 부위 및 염증유발성 시토카인 활성은 각각 서열 20 및 서열 21로 지도화되었다. 따라서, 이들 폴리펩티드는 본 발명의 맥락 내에서 HMGB1 폴리펩티드의 기능성 단

편이다.

- [0040] 통상의 기술자는 예컨대, 국제 공개 번호 W002/092004 (상기 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다)의 방법과 같은 방법을 사용하여 염증유발성 시토카인 활성을 자극할 수 있는 HMGB1 폴리펩티드 및 그의 단편을 확인할 수 있다. 적절하게, HMGB1 폴리펩티드는 서열 15의 아미노산 150-183의 RAGE 결합 도메인 (서열 20 또는 그의 상동체) 및 서열 15의 아미노산 89-109의 염증유발성 시토카인 활성 도메인 (서열 21 또는 그의 상동체)을 포함한다. 특히, HMGB1 폴리펩티드 및 그의 기능성 단편 또는 상동체는 서열 15 또는 16-23의 HMGB1 폴리펩티드와 동일하거나, 또는 99% 이상 동일, 98% 이상 동일, 97% 이상 동일, 96% 이상 동일, 95% 이상 동일, 90% 이상 동일, 85% 이상 동일 또는 80% 이상 동일한 폴리펩티드를 포함한다.
- [0041] 하기에 더욱 상세하게 기술되는 바와 같이, 백신 벡터는 대상체에서 CD40에 결합할 수 있고, 대상체가 벡터 및 그의 관련된 항원에 반응하도록 자극할 수 있는 CD154 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 수지상 세포 (DC)는 순수한 T 세포를 활성화시켜 T 세포 확장 및 효과기 세포로의 분화를 유발할 수 있는 독특한 능력을 가지고 있기 때문에, 그를 포함하는 것은 강력한 면역 반응을 개시하는데 필수적이다. 사실상 모든 신체 조직에서 발견되는 항원 제시 세포 (APC)인 DC의 역할은 항원을 포획하고, 그를 관련된 림프양 조직으로 수송한 후, 그를 순수한 T 세포에 제시하는 것이다. DC에 의해 활성화되고 나면, T 세포는 확장되고, 효과기 세포로 분화하고, 제2 면역 기관을 떠나 말초 조직으로 진입하게 된다. 활성화된 세포독성 T 세포 (CTL)는 바이러스 감염된 세포, 종양 세포 또는 심지어는 세포내 기생충 (예컨대, 살모넬라)으로 감염된 APC를 파괴시킬 수 있고, 바이러스 감염에 대해 방어하는데 중요한 것으로 나타났다. CD40은 TNF-수용체 패밀리의 구성원이고, 전문적인 항원 제시 세포 (APC), 예컨대, DC 및 B 세포를 비롯한 다양한 세포 유형에서 발현된다. CD40과 그의 리간드 CD154 사이의 상호작용은 체액성 및 세포성 면역, 둘 모두에 매우 중요하고, 그를 위해 자극성을 띤다. DC 표면 상에서 발현된 CD40을 통한 DC의 자극은 항-CD40 항체에 의해 모의될 수 있다. 그러나, 이는 신체내에서는 활성화된 T 세포의 표면 상에서 발현된 CD40에 대한 천연 리간드 (즉, CD154)와의 상호작용에 의해 발생하게 된다. 흥미롭게도, CD154의 CD40-결합 영역이 확인되었다. CD154의 CD40-결합 영역은 벡터, 예컨대, 살모넬라 또는 바실루스 벡터의 표면 상에서 발현될 수 있고, 본원에서 제공하는 실시예 및 미국 특허 공개 번호 2011/0027309 (상기 특허는 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다)에 제시된 바와 같이, 공동으로 제시된 펩티드 서열에 대하여 면역 반응을 증진될 수 있다. CD154 폴리펩티드는 CD154 전장의 단백질의 일부 또는 전체 CD154 단백질일 수 있다. 적절하게, CD154 폴리펩티드는 CD40에 결합할 수 있다.
- [0042] 상기 논의된 바와 같이, 항원에 대한 면역 반응을 증진시킬 수 있는 CD154 폴리펩티드를 코딩하는 CD154 폴리뉴클레오티드는 백신에 포함될 수 있다. 적절하게, CD154 폴리펩티드의 길이는 50개 미만의 아미노산 길이, 더욱 적절하게, 40개 미만, 30개 미만 또는 20개 미만의 아미노산 길이이다. 폴리펩티드의 길이는 10 내지 15개의 아미노산 길이, 10 내지 20개의 아미노산 길이, 또는 10 내지 25개의 아미노산 길이일 수 있다. CD154 서열 및 CD40 결합 영역은 다양한 종들 사이에 고도로 보존되지 않는다. 닭 및 인간의 CD154 서열은 각각 서열 24 및 서열 25에 제공되어 있다.
- [0043] 인간, 닭, 오리, 마우스, 및 소를 비롯한, 다수의 종에 대한 CD154의 CD40 결합 영역이 결정되었고, 이는 각각 서열 26, 서열 27, 서열 28, 서열 29, 및 서열 30에 제시되어 있다. 비록 CD40 결합 영역의 서열에 있어 종 사이에는 가변성이 존재하지만, 인간 CD154 폴리펩티드는 닭에서 면역 반응을 증진시킬 수 있었다. 그러므로, 본 발명자들은 종 특이 CD154 폴리펩티드 또는 이종성 CD154 폴리펩티드를 사용하여 본 발명을 실시할 수 있다. 따라서, 서열 24-30의 CD154 폴리펩티드가 백신 벡터에 포함될 수 있거나, 또는 서열 24-30의 서열과 99, 98, 97, 96, 95, 93, 90 또는 85% 이상 동일한 폴리펩티드가 백신 벡터에 포함될 수 있다.
- [0044] CD154로부터의 폴리펩티드는 적어도 부분적으로는 그의 수용체인 CD40에 결합함으로써 면역 반응을 자극시킨다. 폴리펩티드는 대상체의 면역 세포에서 발현되고, 대식세포 및 다른 항원 제시 세포 상의 CD40 수용체에 결합할 수 있는 CD154 폴리펩티드에 상동성이다. 상기 리간드-수용체 복합체의 결합이 대식세포 (및 대식세포 계통 세포, 예컨대, 수지상 세포)를 자극하여, 다른 국소 면역 세포 (예컨대, B-림프구)를 활성화시키는 것으로 공지된 시토카인 분비를 증가시키고 동시에, 포식 및 항원 제시를 증진시킨다. 이로써, 면역 반응 및 확장된 항체 생산을 위해 CD154 펩티드와 관련된 분자가 우선적으로 표적화된다.
- [0045] 항원성 폴리펩티드 및 면역자극성 폴리펩티드는 백신 벡터를 통해 전달된다. 백신 벡터는 박테리아, 효모, 바이러스 또는 리포솜 기반 벡터일 수 있다. 잠재적인 백신 벡터로는 바실루스 (바실루스 쉵틸리스), 살모넬라 (살모넬라 엔테리티디스 (*Salmonella enteritidis*)), 시겔라 (*Shigella*), 에스케리키아 (*Escherichia*) (E. 콜라이 (*E. coli*)), 예르시니아 (*Yersinia*), 보르데텔라 (*Bordetella*), 락토코쿠스 (*Lactococcus*), 락토바실루스

(*Lactobacillus*), 스트렙토코쿠스(*Streptococcus*), 비브리오(*Vibrio*) (비브리오 콜레라에(*Vibrio cholerae*)), 리스테리아(*Listeria*), 효모, 예컨대, 사카로마이세스(*Saccharomyces*), 또는 피치아(*Pichia*), 아테노바이러스, 폭스바이러스, 헤르페스바이러스, 알파바이러스, 및 아테노 관련 바이러스를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 생 박테리아 효모 또는 바이러스 백신 벡터는 면역 약화된 개체에게는 여전히 위험을 초래할 수 있고, 추가의 규제 정밀 조사가 요구될 수 있다. 따라서, 사멸되거나, 불활성화되거나, 또는 미국 식품의약국(Food and Drug Administration: FDA)에 의해 일반적으로 안전하다고 인정하는(Generally Recognized As Safe: GRAS) 유기체로서의 자격을 얻은 벡터를 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 문제는 상기 벡터를 사용하여 강력한 면역 반응을 생성하는 것이다. 박테리아, 효모 또는 바이러스 백신 벡터를 불활성화시키거나, 또는 사멸시키는 방법은 통상의 기술자에게 공지되어 있으며, 방법, 예컨대, 포르말린 불활성화, 항생제 기반 불활성화, 열 처리 및 에탄올 처리를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 본 발명자들은 백신 벡터의 표면 상에 면역자극성 폴리펩티드, 예컨대, HMGB1 (고이동성 그룹 박스 1) 폴리펩티드를 포함함으로써 바실루스 종을 사용하여 아피콤플렉산 기생충에 대한 강력한 면역 반응을 생성할 수 있다. 실제로, 본 실시예에서는 본 벡터가 투여 후에는 복제가 불가능하고, 여전히 강력한 면역 반응을 유도할 수 있도록 불활성화될 수 있다는 것이 입증된다. 백신 벡터는 비병원성인 야생형 박테리아, 효모 또는 바이러스일 수 있다. 대안적으로, 벡터는 벡터가 숙주에서 복제할 수 있는 제한된 능력을 가지거나, 또는 수세대 동안에 걸쳐 보충된 배지 없이는 성장할 수 없도록 약독화될 수 있다. 통상의 기술자는 벡터를 약독화하는 방법 및 그를 수행하는 수단이 다양하게 존재한다는 것을 이해할 것이다.

[0046] 항원성 폴리펩티드의 적어도 일부 및 면역자극성 폴리펩티드의 적어도 일부가 백신 벡터의 표면 상에 존재하거나, 또는 그 표면 상에서 발현된다. 백신 벡터의 표면 상에 존재하는 것은 막횡단 단백질의 외부 루프 내에 포함되고, 막횡단 단백질, 막 지질 또는 막 고정된 탄수화물 또는 폴리펩티드와 상호작용하는, 예컨대, 그와 공유적으로 또는 화학적으로 가교결합된 폴리펩티드를 포함한다. 폴리펩티드는 아미노산을 포함하는 폴리펩티드가 N-말단, C-말단 또는 막횡단 단백질내 어느 위치에도 그-의 펩티드 결합을 통해 연결됨으로써 (즉, 막횡단 단백질의 두 아미노산 사이에 삽입되거나, 또는 막횡단 단백질의 하나 이상의 아미노산을 대신하여 삽입됨으로써 (즉, 결실-삽입)) 막횡단 단백질 내에 포함될 수 있다. 적합하게, 폴리펩티드는 막횡단 단백질의 외부 루프 내로 삽입될 수 있다. 적합한 막횡단 단백질은 *srtA*, *cotB* 및 *lamB*이지만, 통상의 기술자는 다수의 적합한 막횡단 단백질이 이용가능하다는 것을 이해할 것이다. 폴리펩티드는 항원성 폴리펩티드 및 면역자극성 폴리펩티드가 백신 벡터의 표면 상에서 발현될 수 있도록 막 또는 세포벽 고정된 단백질 또는 지질에 연결될 수 있다.

[0047] 상기 기술된 바와 같이, 항원성 또는 면역자극성 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 벡터의 염색체 내로 삽입될 수 있거나, 또는 (예컨대, 플라스미드, BAC 또는 YAC 상에 존재하는 것과 같이) 염색체외에 유지될 수 있다. 통상의 기술자는 이들 폴리뉴클레오티드가 다양한 폴리뉴클레오티드 중의 프레임내에 삽입될 수 있고, 벡터의 상이한 부분에서 발현될 수 있거나, 분비될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 항원성 폴리펩티드에 대한 면역 반응을 증진시킬 수 있는 면역자극성 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 또한 항원성 폴리펩티드를 코딩할 수 있다. 항원성 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 면역자극성 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 연결될 수 있고, 이로써 벡터 중 두 폴리펩티드는 예컨대, 융합 단백질에서와 같이 동일한 폴리펩티드의 일부이다. 본 실시예에서, 항원성 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 또한 면역자극성 폴리펩티드를 코딩한다. 한 실시양태에서, 폴리펩티드를 코딩하는 두 폴리뉴클레오티드 둘 모두는 살모넬라 엔테리티디스 또는 또 다른 백신 벡터의 *lamB* 유전자의 루프 9 중의 프레임내로 삽입된다. 통상의 기술자는 다른 막횡단 단백질을 코딩하는 박테리아 폴리뉴클레오티드 및 *lamB* 유전자의 다른 루프 또한 사용될 수 있다는 것을 이해할 것이다.

[0048] 대안적으로, 항원성 폴리펩티드 및/또는 면역자극성 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 백신 벡터의 표면 상의 단백질, 지질 또는 탄수화물과의 회합을 통해 백신 벡터의 표면 상에 디스플레이되거나, 또는 제시되는 분비 폴리펩티드 내로 삽입될 수 있다. 통상의 기술자는 항원성 폴리펩티드 및/또는 면역자극성 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 매우 다양한 백신 벡터 폴리뉴클레오티드에 삽입될 수 있고, 이로써 항원성 폴리펩티드 및/또는 면역자극성 폴리펩티드를 발현할 수 있고, 백신 벡터의 표면 상에의 발현에 의해 백신 벡터로 처리된 대상체의 면역 세포에 상기 항원성 폴리펩티드 및/또는 면역자극성 폴리펩티드를 제시할 수 있다는 것을 이해할 것이다. 아피콤플렉산 롬보이드 폴리펩티드 및 면역자극성 폴리펩티드의 코딩 영역은 리스테리아로부터의 소르타제에 대한 분류 모티프를 함유하는 스태필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 퍼프로틴 결합 단백질의 C-말단에 융합될 수 있다. 이로써 분비 단백질은 그람 양성 박테리아, 예컨대, 바실루스의 세포벽에 고정될 수 있다. 문헌 [Nguyen and Schumann, J Biotechnol (2006) 122: 473-482] (상기 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다)을 참조할 수 있다. 본 실시예에서는 상기 시스템을 사용하여 HMGB1에 연결된 롬보

이드 폴리펩티드가 바실루스의 표면 상에서 발현될 수 있도록 하였다. 다른 유사 방법 또한 사용될 수 있다.

[0049] 대안적으로, 바이러스 벡터가 통상의 기술자에게 이용가능한 방법을 통해 사용된다면, 폴리펩티드는 막, 세포벽, 또는 캡시드에의 단백질, 지질, 또는 탄수화물에 공유적으로 또는 화학적으로 연결될 수 있다. 예를 들어, 항원성 및 면역자극성 폴리펩티드를 백신 벡터의 표면 상에 제시하는데 이황화 결합 또는 비오틴-아비딘 가교결합이 사용될 수 있다. 적합하게, 항원성 폴리펩티드 및 면역자극성 폴리펩티드는 융합 단백질의 일부이다. 두 폴리펩티드는 펩티드 결합을 통해 직접 연결될 수 있거나, 또는 링커, 스페이서, 또는 그가 프레임내로 삽입되는 제3 단백질의 섹션에 의해 이격화될 수 있다. 본 실시예에서는 폴리펩티드 사이에 아미노산 스페이서가 사용되었다. 스페이서는 2 내지 20개의 아미노산, 적합하게, 4 내지 10개의 아미노산, 적합하게, 6 내지 8개의 아미노산일 수 있다. 적합하게, 스페이서 중의 아미노산은 소형 측쇄를 가지고, 비하전된 것, 예컨대, 글리신, 알라닌 또는 세린이다. 본 실시예에서는 2개의 글리신 잔기, 2개의 세린 잔기 및 아르기닌, 및 2개 초과 의 세린 잔기를 포함하는 스페이서가 사용되었다. 통상의 기술자는 다른 스페이서가 사용될 수 있다는 것을 이해할 것이다.

[0050] 본 실시예에서, 백신 벡터는 같은 폴리뉴클레오티드 상에서 코딩되고, 서로 프레임내에 존재하는 항원성 폴리펩티드 (MPP 및/또는 TRAP 폴리펩티드) 및 면역자극성 폴리펩티드 (CD154 또는 HMGB1, 둘 다)를 가진다. 대체 실시양태에서, 면역자극성 폴리펩티드 및 항원성 폴리펩티드는 상이한 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩될 수 있다. 통상의 기술자는 백신 벡터의 표면 상에 항원성 폴리펩티드 및 HMGB1 폴리펩티드를 발현시키는데 다양한 방법이 사용될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 상기 방법은 통상의 기술자에게 공지되어 있다.

[0051] 백신 벡터 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 조성물 또한 제공한다. 제약상 허용되는 담체는 생체내 투여에 적합한 임의의 담체이다. 적합하게, 제약상 허용되는 담체는 경구적, 비강, 또는 점막 전달을 위해 허용된다. 제약상 허용되는 담체로는 물, 완충처리된 용액, 글루코스 용액 또는 박테리아 배양액을 포함할 수 있다. 조성물의 추가의 성분으로는 적합하게 부형제, 예컨대, 안정제, 보존제, 희석제, 유화제 및 운환제를 포함할 수 있다. 제약상 허용되는 담체 또는 희석제의 예로는 안정제, 예컨대, 탄수화물 (예컨대, 소르비톨, 만니톨, 전분, 수크로스, 글루코스, 텍스트란), 단백질, 예컨대, 알부민 또는 카제인, 단백질 함유 작용제, 예컨대, 소 혈청 또는 탈지유 및 완충제 (예컨대, 포스페이트 완충제)를 포함한다. 특히 상기 안정제가 조성물에 첨가될 때, 조성물은 냉동 건조 또는 분무 건조하는데 적합하다. 조성물 중 백신 벡터는 복제할 수 없고, 적합하게, 백신 벡터는 조성물에 첨가되기 이전에 불활성화되거나, 사멸화된다.

[0052] 백신 벡터를 투여함으로써 대상체에서 면역 반응을 증진시키는 방법 또한 제공한다. 백신 벡터는 아피콤플렉산 롬보이드 폴리펩티드를 코딩하는 제1 폴리뉴클레오티드, 및 면역자극성 폴리펩티드를 코딩하는 제2 폴리뉴클레오티드를 함유할 수 있다. 면역자극성 폴리펩티드는 적합하게 천연적으로 척추동물 면역계와 관련이 있고, 면역 반응을 자극하는데 관여하는 폴리펩티드이다. 면역자극성 폴리펩티드는 대상체의 천연 또는 적응 면역 반응을 자극시킬 수 있다. 적합하게, 상기에 더욱 상세하게 기술되어 있는 HMGB1 폴리펩티드 또는 CD154 폴리펩티드가 면역자극성 폴리펩티드로서 사용될 수 있다. 본원에서 제공하는 방법에서, 아피콤플렉산 롬보이드 폴리펩티드 및 면역자극성 폴리펩티드를 포함하는 백신 벡터를, 백신 벡터에 대한, 및 특히 항원성 롬보이드 폴리펩티드에 대한, 및 적합하게는 아피콤플렉산 기생충에 대한 대상체의 면역 반응을 증진시키거나, 또는 그를 일으키는데 효과적인 양으로 대상체에게 투여된다. 증진된 면역 반응으로는 항체 또는 T 세포 반응을 포함할 수 있다. 적합하게, 면역 반응은 방어 면역 반응이지만, 면역 반응은 완전하게 방어적일 수는 없지만, 감염과 관련된 이환 또는 사망을 감소시킬 수 있다. 면역자극성 폴리펩티드는 롬보이드 폴리펩티드 이외에도 백신 벡터에 존재하는 임의의 외부 항원 또는 항원성 폴리펩티드에 대한 대상체의 면역 반응을 증진시키는데 사용될 수 있다. 통상의 기술자는 면역자극성 폴리펩티드가 백신 벡터 중에 존재하는 1 초과의 항원성 폴리펩티드에 대한 면역 반응을 증진시키는데 사용될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 면역 반응을 증진시키는 것은 대상체의 면역계에 의해 매개되는 치료학적 또는 예방학적 효과를 유도하는 것을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 구체적으로, 면역 반응을 증진시키는 것은 항체 제조 증진, 항체 중쇄의 클래스 전환 증진, 항원 제시 세포 성숙, 헬퍼 T 세포 자극, 세포용해성 T 세포 자극, 또는 T 및 B 세포 기억 유도를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0053] 적합하게, 백신 벡터는 HMGB1 폴리펩티드 (서열 15)의 아미노산 150-183 및 89-109를 포함하는 폴리펩티드, 또는 그의 상동체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 함유한다. 본 실시예에서는 HMGB1의 190개의 아미노산 폴리펩티드가 사용되었다. 적합하게, 폴리뉴클레오티드는 대상체와 같은 종으로부터의 HMGB1 폴리펩티드를 코딩한다. HMGB1이 많은 종 사이에 고도로 보존되기 때문에, HMGB1 폴리펩티드 및 대상체의 것 (예컨대, 닭 백신에서 사용하기 위한 인간 HMGB1 폴리펩티드)의 이종성 조합은 본 발명의 방법에서 유용할 수 있다. HMGB1 폴리펩티드를 사용하여 백신 벡터 중에 존재하는 1 초과의 항원성 폴리펩티드에 대한 면역 반응을 증진시킬 수 있다. HMGB1

로부터의 폴리펩티드는 적어도 부분적으로는 수지상 세포 및 대식세포를 활성화시키고, 이로써 시토카인, 예컨대, IL-1, IL-6, IFN- γ 및 TNF- α 의 생산을 자극시킴으로써 면역 반응을 자극시킨다. 본 실시예에서는 HMGB1의 폴리펩티드가 백신 벡터의 표면 상에서 발현되었다.

[0054] 백신 벡터는 적합하게 CD40에 결합할 수 있고, CD40을 활성화시킬 수 있는 CD154 폴리펩티드를 함유할 수 있다. CD40에 결합할 수 있는 CD154 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 백신은 백신에 대한 대상체의 면역 반응을 증진시키거나, 또는 그를 일으키는데 효과적인 양으로 대상체에게 투여된다. 적합하게, 백신은 인간 CD154 폴리펩티드 (서열 25)의 아미노산 140-149를 포함하는 폴리펩티드, 또는 그의 상동체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 함유한다. 상기 언급한 바와 같이, 하나의 종으로부터 유래된 아미노산 140-149의 상동체는 다른 종에서의 면역 반응을 자극하는데 사용될 수 있다. 적합하게, 폴리뉴클레오티드는 대상체와 동일한 종으로부터의 CD154 폴리펩티드를 코딩한다. 적합하게, 서열 26의 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 인간 대상체에서 사용되고, 서열 27의 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 닭에서 사용되고, 서열 28의 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 오리에서 사용되고, 서열 29의 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 마우스에서 사용되고, 서열 30의 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 소에서 사용된다. 인간 CD154 폴리펩티드 (서열 26)는 닭 백신에서 사용되었고, 외부 항원에 대한 면역 반응을 증진시키는 것으로 입증되었다. 따라서, CD154 폴리펩티드 및 대상체의 것의 다른 이중성 조합은 본 발명의 방법에서 유용할 수 있다.

[0055] 추가로, 아피콤플렉산 기생충에 대한 면역 반응을 증진시키는 방법 및 아피콤플렉산 기생충에 의한 후속 감염과 관련된 이환을 감소시키는 방법을 개시한다. 간략하면, 본 방법은 대상체에게 유효량의, 아피콤플렉산 롬보이드 폴리펩티드를 코딩하는 제1 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 백신 벡터를 투여하는 단계를 포함한다. 백신 벡터는 또한 면역자극성 폴리펩티드를 코딩하는 제2 폴리뉴클레오티드를 유효량으로 포함할 수 있다. 롬보이드 폴리펩티드는 서열 1-4, 37, 38 또는 그의 조합 또는 단편을 포함할 수 있다. 롬보이드 폴리펩티드의 벡터 내로의 삽입은 문헌 [BMC Biotechnol. 2007 Sept, 17: 7(1): 59, Scarless and Site-directed Mutagenesis in *Salmonella* Enteritidis chromosome] (상기 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다)에 기술된 무자국 (scarless) 부위-지정 돌연변이 시스템, 및 문헌 [Nguyen and Schumann J Biotechnol 2006 122: 473-482] (상기 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다)에 기술된 바와 같은, 본원에서 사용된 방법을 포함하나, 이에 한정되지 않는, 통상의 기술자에게 공지된 다양한 방법으로 달성될 수 있다. 벡터는 또한 아피콤플렉산 기생충으로부터의 다른 항원성 폴리펩티드, 예컨대, TRAP, 또는 바이러스, 예컨대, 인플루엔자 M2e 또는 박테리아, 예컨대, 살모넬라 또는 E. 콜라이를 비롯한 다른 병원체로부터의 다른 항원성 폴리펩티드와 함께 롬보이드 폴리펩티드를 발현하도록 조작될 수 있다. 특히, CD40 또는 HMGB1에 결합할 수 있는 CD154 폴리펩티드는 롬보이드 폴리펩티드에 대한 대상체의 면역 반응을 증진시키기 위해 벡터에 의해 발현될 수 있다.

[0056] 항원성 폴리펩티드를 함유하는 조성물은 또한 아피콤플렉산 기생충에 의한 후속 감염과 관련된 이환을 감소시키는데 사용될 수 있다. 조성물은 기생충이 질환을 유발하는 것을 예방할 수 있거나, 또는 본원에 기술된 조성물 또는 백신 벡터를 투여받은 대상체에서 임의의 관련된 이환을 제한하거나, 감소시킬 수 있다. 본원에 기술된 조성물 및 백신 벡터는 질환 기속 기간, 체중 감소, 질환 증상의 중증도를 감소시키거나, 질환과 관련된 이환 또는 사망을 감소시키거나, 또는 질환에 걸릴 가능성을 감소시킴으로써 후속 질환의 중증도를 감소시킬 수 있다. 조성물은 또한 기생충 전파를 억제시킴으로써 기생충 확산을 감소시킬 수 있다. 본원에 기술된 백신 벡터 투여 이후, 질환과 관련된 이환 또는 사망은 백신 벡터를 제공받지 않은 유사 대상체와 비교하였을 때 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 심지어는 100%만큼 감소될 수 있다.

[0057] 동물 또는 인간에게 투여하는 경우, 조성물은 비내로, 근육내로, 분무에 의해, 진피내로, 비경구적으로, 피하로, 복강내로, 정맥내로, 두개내로, 경구적으로, 에어로졸에 의해 또는 근육내로인 것을 포함하나, 이에 한정되지 않는, 다양한 수단에 의해 투여될 수 있다. 점안 투여, 경구 위관 영양법 또는 식수 또는 식품에의 첨가가 추가로 적합하다. 가금류의 경우, 조성물은 난내로 투여될 수 있다.

[0058] 본 발명의 일부 실시양태는 대상체에서 면역 반응을 증진시키는 방법을 제공한다. 적합한 대상체로는 척추동물, 적합하게, 포유동물, 적합하게, 인간, 및 조류, 적합하게, 가금류, 예컨대, 닭 또는 칠면조를 포함할 수 있지만, 이에 한정되지 않는다. 다른 동물, 예컨대, 소, 고양이, 개 또는 돼지 또한 사용될 수 있다. 적합하게, 대상체는 비인간이고, 농업용 동물일 수 있다.

[0059] 투여하고자 하는 백신의 유용한 투여량은 대상체의 연령, 체중 및 종, 투여 모드 및 경로, 및 면역 반응 유발의 대상이 되는 병원체 유형에 따라 달라질 것이다. 조성물은 면역 반응을 유발하는데 충분한 임의의 용량으로 투여될 수 있다. 10^3 내지 10^{10} 의 벡터 카피수 (즉, 콜로니 형성 단위 또는 플라크 형성 단위), 10^4 내지 10^9 의 백

터 카피수, 또는 10^5 내지 10^7 의 벡터 카피수 범위의 용량이 적합하다는 것이 구상된다.

[0060] 면역 반응을 증진시키기 위해 조성물은 단 1회 투여될 수 있거나, 또는 2회 이상에 걸쳐 투여될 수 있다. 예를 들어, 조성물은 1주, 2주, 3주, 1개월, 2개월, 3개월, 6개월, 1년, 또는 그 초과와 간격을 두고 2회 이상에 걸쳐 투여될 수 있다. 백신 벡터는 투여 이전에 생존가능한 미생물을 포함할 수 있지만, 일부 실시양태에서, 벡터는 투여 이전에 사멸된 것일 수 있다. 일부 실시양태에서, 벡터는 대상체에서 복제될 수 있는 반면, 다른 실시양태에서 벡터는 대상체에서 복제될 수 없을 수도 있다. 벡터로서 사용되는 미생물을 불활성화시키는 방법은 통상의 기술자에게 공지되어 있다. 예를 들어, 포르말린, 에탄올, 열 노출 또는 항생제를 사용함으로써 박테리아 백신 벡터를 불활성화시킬 수 있다. 통상의 기술자는 또한 다른 방법도 사용할 수 있다.

[0061] 다중의 항원에 대하여 증진된 면역 반응을 생성하기 위해 동일하거나, 또는 상이한 병원체로부터의 수개의 에피토프 또는 항원이 단일 백신으로 조합하여 투여될 수 있다는 것이 구상된다. 재조합 백신은 다중 병원성 미생물, 바이러스 또는 중앙 관련 항원으로부터의 항원을 코딩할 수 있다. 다중 항원을 발현할 수 있는 백신을 투여하는 것은 동시에 2가지 이상의 질환에 대한 면역을 유도한다는 장점을 가진다. 예를 들어, 생 약독화된 박테리아는 단일 병원체로부터의 다중 항원, 예컨대, TRAP (서열 6) 및 에이메리아 (서열 2)로부터의 MPP에 대한; 또는 상이한 병원체, 예컨대, 에이메리아 및 인플루엔자 또는 살모넬라로부터의 다중 항원에 대한 면역 반응을 유도하는데 적합한 벡터를 제공한다.

[0062] 백신 벡터는 관련 기술분야에 주지된 방법을 사용하여 임의의 비필수 부위에서 백신 벡터 내로 삽입될 수 있거나, 또는 대안적으로, 플라스미드 또는 다른 염색체의 비핵질 (예컨대, BAC 또는 YAC) 상에서 운반될 수 있는, 항원을 코딩하는 외인성 폴리뉴클레오티드를 사용함으로써 구축될 수 있다. 폴리뉴클레오티드의 삽입을 위해 적합한 한 부위는 막형단 단백질의 외부 부위 내에 존재하거나, 또는 분비 경로를 위해 외인성 폴리뉴클레오티드를 표적하고/거나, 세포벽에 부착될 수 있도록 허용하는 서열에 커플링된다. 폴리뉴클레오티드의 삽입을 위해 적합한 막형단 단백질의 일례로는 *lamB* 유전자가 있다. 세포벽 부착의 적합한 방법은 실시예에 제공되어 있다.

[0063] 외인성 폴리뉴클레오티드로는 병원성 미생물 또는 바이러스로부터 선택되는 항원을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하나, 이에 한정되지 않고, 효과적인 면역 반응이 생성되도록 하는 방식으로 발현되는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 그러한 폴리뉴클레오티드는 병원성 바이러스, 예컨대, 인플루엔자 (예컨대, M2e, 헤마글루티닌, 또는 뉴라미니다제), 헤르페스바이러스 (예컨대, 헤르페스바이러스의 구조 단백질을 코딩하는 유전자), 레트로바이러스 (예컨대, gp160 외피 단백질), 아데노바이러스, 파라믹소바이러스, 코로나바이러스 등으로부터 유래될 수 있다. 외인성 폴리뉴클레오티드는 또한 예컨대, 박테리아 단백질, 예컨대, 독소, 외막 단백질 또는 다른 고도로 보존되는 단백질을 코딩하는 유전자와 같이, 병원성 박테리아로부터 수득될 수 있다. 추가로, 기생충, 예컨대, 다른 아피콕플렉산 기생충으로부터의 외인성 폴리뉴클레오티드는 벡터 백신에서 사용하기 위한 것으로 관심의 대상이 되는 후보물질이 된다.

[0064] 본 개시내용은 본원에 기술된 구축, 성분의 배열, 또는 방법 단계에 관한 구체적인 상세한 설명으로 한정되지 않는다. 본원에 개시된 조성물 및 방법은 하기 개시내용에 비추어 통상의 기술자에게 자명한 다양한 방식으로 제조, 실시, 사용, 수행 및/또는 형성될 수 있다. 본원에서 사용된 어구 및 용어는 단지 기술하기 위한 것이며, 청구범위의 범주를 제한하는 것으로 간주되지 않아야 한다. 설명 및 청구범위에서 다양한 구조 또는 방법 단계를 지칭하기 위해 사용된 바, 예컨대, 제1, 제2, 및 제3이라는 서수 표시는 임의의 구체적인 구조 또는 단계, 또는 상기 구조 또는 단계에 대한 임의의 특정 순서 또는 배열을 나타내는 것으로 해석되지 않도록 한다. 본원에 기술된 모든 방법은 본원에서 달리 명시되지 않는 한, 또는 문맥상 명백하게 모순되지 않는 한, 임의의 적합한 순서로 수행될 수 있다. 본원에서 제공하는 임의의 및 모든 일례, 또는 예시 용어 (예컨대, "예컨대")를 사용하는 것이 단순히 본 개시내용을 용이하게 하기 위한 것이며, 달리 청구되지 않는 한, 본 개시내용의 범주를 제한하는 것을 암시하는 것은 아니다. 본 명세서에서 어떤 용어도, 및 도면에 제시된 어떤 구조도, 청구되지 않은 임의의 요소가 개시된 주제의 실시예 필수적이라는 것을 나타내는 것으로 해석되지 않아야 한다. "비롯한," "포함하는," 또는 "가지는"이라는 용어 및 그의 파생어는 이하 열거하는 요소 및 그의 등가물 뿐만 아니라, 추가의 요소를 포함하는 것으로 한다. 특정 요소를 "비롯한," "포함하는," 또는 "가지는" 것으로 언급되는 실시양태는 또한 상기 특정 요소"로 본질적으로 이루어진," 및 그"로 이루어진" 것으로 간주된다. "단수" 용어는 달리 구체적으로 설명되지 않는 한, 하나 또는 1 초과를 의미할 수 있다.

[0065] 본원에서 달리 명시되지 않는 한, 본원에서 값을 범위로 언급하는 것은 단지 상기 범위 내에 포함되어 있는 각각의 개별 값을 개별적으로 지칭하는 단축 방법으로서의 역할을 하는 것으로 하며, 각각의 개별 값은 마치 그

값이 본원에서 개별적으로 언급된 것과 같이 본 명세서에 포함된다. 예를 들어, 농도 범위가 1% 내지 50%로 언급되었다면, 값, 예컨대, 2% 내지 40%, 10% 내지 30%, 또는 1% 내지 3% 등이 본 명세서에서 명백하게 열거된 것으로 한다. 이는 단지 구체적으로 의도되는 것인 일례일 뿐이며, 열거된 최저값 및 최고값을 비롯하여, 그 값 사이의 수치 값의 모든 가능한 조합이 본 개시내용에서 명백하게 언급된 것으로 간주되어야 한다. 특정의 언급된 양 또는 양의 범위를 기술하기 위해 "약"이라는 단어를 사용하는 것은 예컨대, 제작 공차, 치수 측정시 계기 및 인간 오차 등에 기인하여 해명될 수 있거나, 또는 자연적으로 그렇게 되는 값과 같은, 언급된 양에 매우 가까운 값이 상기 양에 포함된다는 것을 나타내는 것으로 한다. 양을 지칭하는 모든 백분율(%)은 달리 언급되지 않는 중량%이다.

[0066] 하기 실시예는 단지 예시적인 것으로 하며, 본 발명의, 또는 첨부된 청구범위의 범주를 제한하는 것으로 의미되지 않는다. 본원에서 인용된, 특허, 특허 공개 및 비특허 문헌을 비롯한 모든 참고 문헌은 그의 전문이 본원에서 참조로 포함된다. 참고 문헌에서의 언급 내용과 본원에서 언급된 것 사이에 임의의 상충 사항이 존재할 경우, 이는 본원에 포함된 언급 내용을 지지하는 방식으로 해결되어야 한다.

[0067] 실시예

[0068] 실시예 1. 백신 벡터 구축

[0069] 효능을 검사하고, 각각이 에이메리아 막시마 접종으로부터의 방어에 대하여 미치는 영향을 측정하기 위한 목적으로 다중의 백신 조합을 구축하였다. 본 실시예에서 사용된 구축물을 보여주는 카툰은 도 2에 제시되어 있다. TRAP MPP HMGB1, 및 MPP HMGB1 서열을 합성하고, 세포 표면 발현을 위해 pNDH10 플라스미드로 삽입하였다. 5' 단부의 BamHI 제한 부위, 및 피브로넥틴 결합 단백질 B (*fbpB*) 바로 옆에 인접한 3' 단부의 AatII 제한 부위를 이용하여 각 서열을 합성하였다. 백신 서열 및 *fbpB*의 발현은, 앞서 pNDH10 플라스미드 내로 삽입된 *xyI* 오페론에 의해 조절되었다 [1]. *fbpB*는 *fbpB*를 소르타제 A 발현 박테리아의 세포 표면에 고정시키는 소르타제 A에 의해 인식된 분류 모터프를 포함하였다 [1]. 따라서, *fbpB*가 세포벽 상의 소르타제 A에 고정되었을 때, 백신 벡터 서열이 박테리아의 표면 상에서 발현될 수 있도록 백신 서열을 *fbpB*와 함께 상류에 및 프레임내에 배치하였다. 소르타제 A를 발현하는 바실루스 쉵틸리스 1A857로 백신 서열, *fbpB*, 및 *xyI* 오페론을 함유하는 플라스미드 pNDH10을 형질전환시켰다 [2]. 0.6 μ g의 인서트/플라스미드를 0.1 M 에틸렌 글리콜 테트라아세트산 (EGTA)과 함께 수행 능력이 있는 1A857 배양물에 첨가함으로써 각 플라스미드를 1A857로 형질전환시켰다. 형질전환 후, 클로람페니콜 아세틸 트랜스퍼라제를 코딩하는 *cat* 서열을 통해 플라스미드가 부여한 항생제 저항성을 보유하는 세포만을 선별하기 위하여 5 μ g/mL 클로람페니콜을 함유하는 LB 아가 상에서 pNDH10을 발현하는 1A857을 선별하였다. 플라스미드 추출 후, PCR을 수행함으로써 MPP HMGB1 (서열 33), 또는 TRAP MPP HMGB1 (서열 31) pNDH10 플라스미드로 형질전환된 바실루스 쉵틸리스 1A857을 확인하였다. 각 1A857/pNDH10/인서트 구축물을 5 μ g/mL 클로람페니콜을 포함하는 LB 브로쓰 + 0.1% 글루코스 중 0.6% 크실로스에서 37°C에서 9 h 동안 진탕시키면서 성장시키고, 유도화하였다. 토기 항-HMGB1 항체와 함께 간접 형광 현미경법 및 웨스턴 블롯에 의해 MPP-HMGB1 (서열 34) 및 TRAP-MPP-HMGB1 (서열 32) 단백질 발현을 확인하였다.

[0070] 실시예 2. 에이메리아 감염 후 닭의 이환 및 사망 감소

[0071] 벡터화된 백신 MPP HMGB1 및 TRAP MPP HMGB1을 변형된 키토산 애주번트와 함께 식수를 통해 투여되었을 때, 에이메리아 막시마 접종으로부터 방어할 수 있는 능력에 대하여 시험하였다. 브로일러 닭의 나이가 4 및 14일째가 되었을 때 24 h 동안 1:128의 희석률 (5×10^5 cfu/닭)로 식수 중의 각 백신을 이용하여 백신화하였다. 나이가 21일째가 되었을 때, 모든 군의 체중을 측정하고, 경구 위관 영양법에 의해 4×10^4 의 E. 막시마(*E. maxima*)의 포자충(sporulated oocyst)을 접종하였다. 나이가 28일째가 되었을 때, 접종 기간 동안 생존한 닭의 체중(BW) 및 체중 증가량(BWG)을 기록하였다. 추가로, 사망률을 문서로 기록하여 백신 후보물질의 효능을 측정하였다. 접종 후 8일째, BW는 백신화되지 않은 닭과 비교하였을 때, TRAP-MPP-HMGB1 및 MPP-HMGB1로 백신화된 닭에서 유의적으로 더 높았다 (도 3). 접종 후 8d에 BWG는 대조군과 비교하였을 때, 모든 백신화된 군의 경우에 유의적으로 더 높았다 (도 4). 사망률 또한 백신화되지 않은 군보다 TRAP-MPP-HMGB1 및 MPP-HMGB1 백신화된 군에서 유의적으로 더 낮았다 (도 5).

[1] Kim L, Mogk A, Schumann W. A xylose-inducible *Bacillus subtilis* integration vector and its application. *Gene* 1996 Nov 28;181(1-2):71-6.

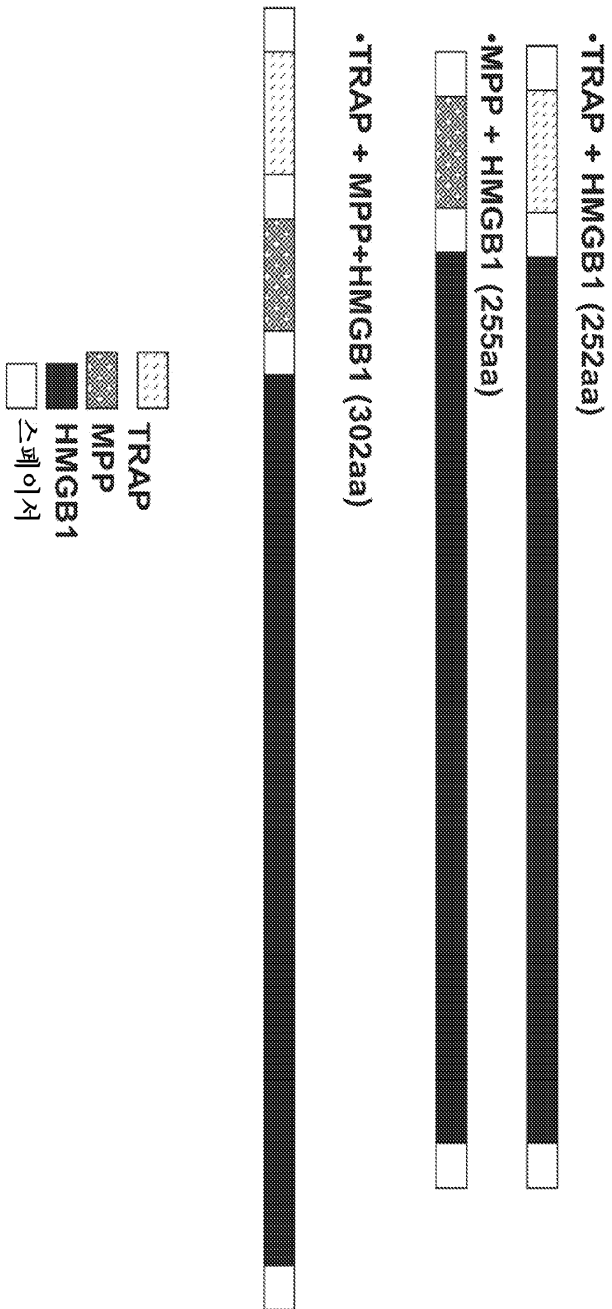
[2] Nguyen HD, Schumann W. Establishment of an experimental system allowing immobilization of proteins on the surface of *Bacillus subtilis* cells. *Journal of biotechnology* 2006 Apr 20;122(4):473-82.

도면

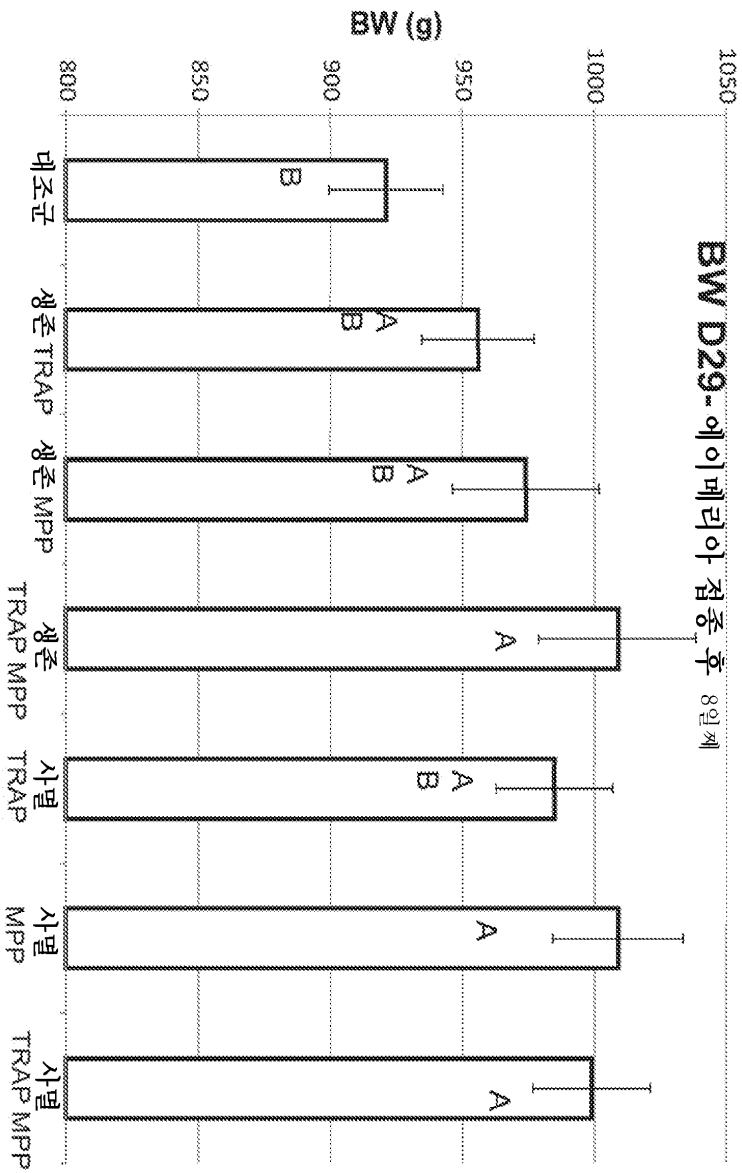
도면1



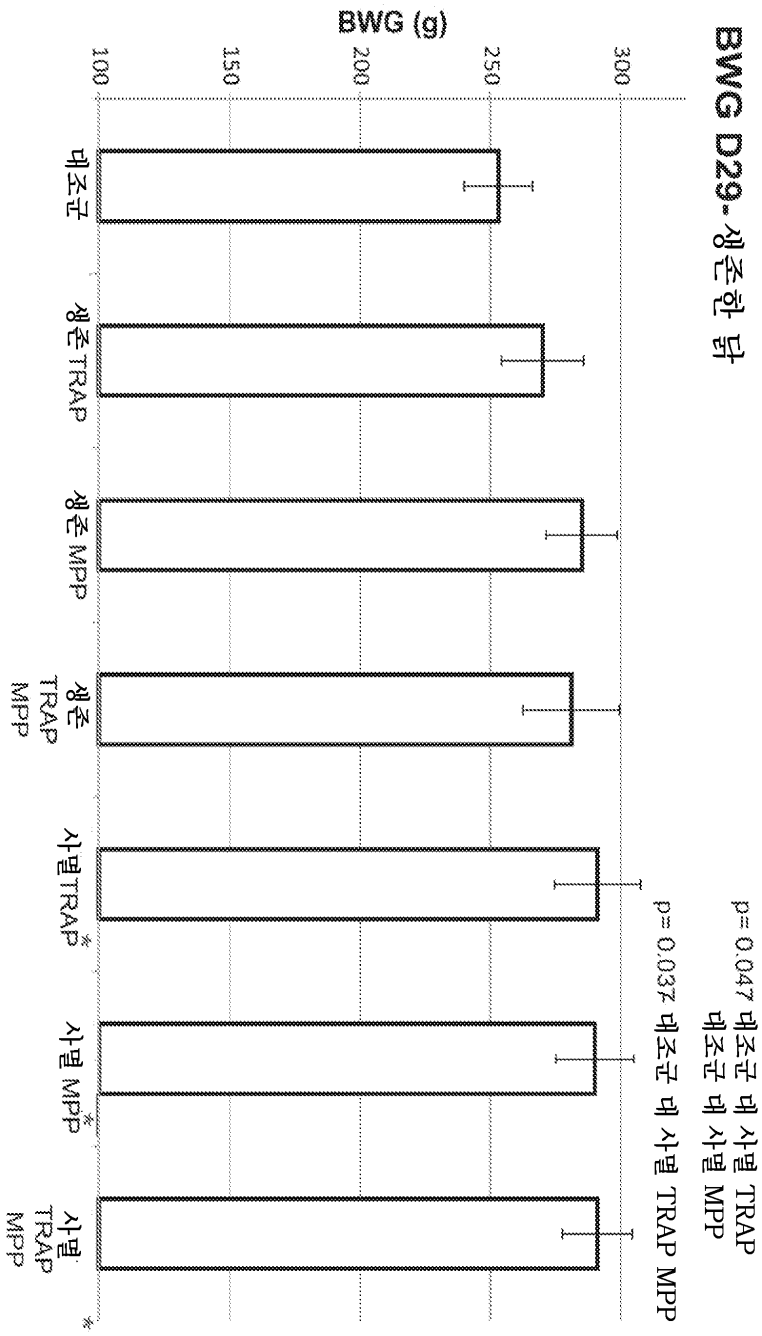
도면2



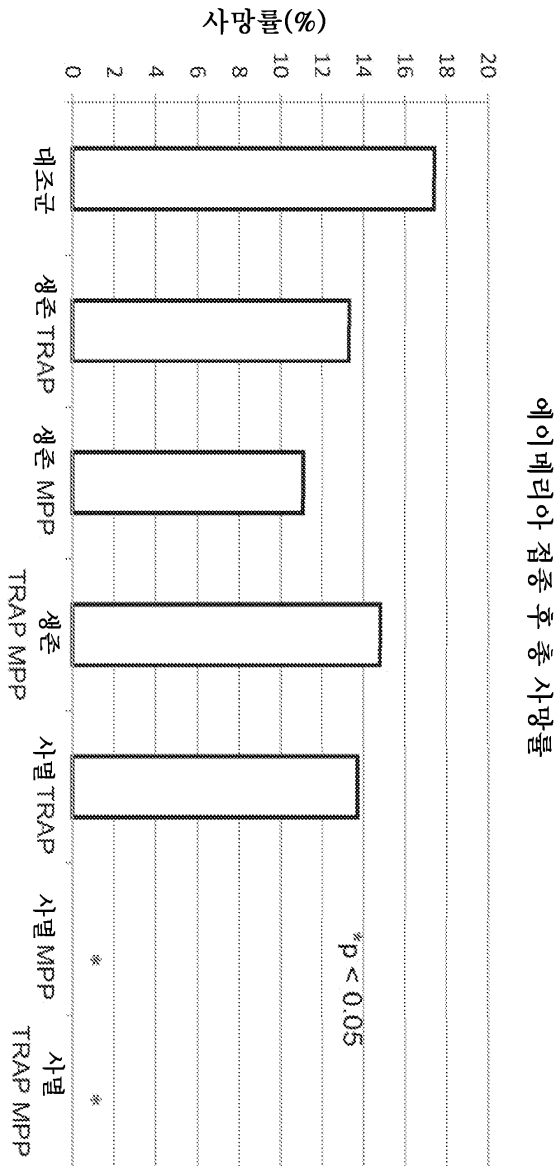
도면3



도면4



도면5



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> SHIVARAMAIAH, Srichaitanya

HARGIS, Billy

BARTA, John

BERGHMAN, Luc

FAULKNER, Olivia

BIELKE, Lisa

<120> COMPOSITIONS AND METHODS OF ENHANCING IMMUNE RESPONSES TO EIMERIA
OR LIMITING EIMERIA INFECTION

<130> 5658-00201
 <150> US 61/764,681
 <151> 2013-02-14
 <160> 40
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic: composite minimal epitope

 <220><221> misc_feature
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa is Arg or Met
 <220><221> misc_feature
 <222> (3)..(4)
 <223> Xaa is Val or Ile
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa is Ser or Arg
 <220><221> misc_feature
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa is Phe or Tyr
 <220><221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa is His or Tyr
 <400> 1
 Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Tyr Gly Ala Cys Glu Xaa Asn Leu Gly
 1 5 10 15
 <210> 2

 <211> 43
 <212> PRT
 <213> Eimeria maxima
 <220><221> misc_feature

<222> (1)..(43)

<223> Eimeria maxima MPP

<400> 2

Pro Ser His Asp Ala Pro Glu Ser Glu Arg Thr Pro Arg Val Ile Ser

1 5 10 15

Phe Gly Tyr Gly Ala Cys Glu His Asn Leu Gly Val Ser Leu Phe Arg

 20 25 30

Arg Glu Glu Thr Lys Lys Asp Pro Arg Gly Arg

 35 40

<210> 3

<211> 28

<212> PRT

<213> Neospora canium

<400> 3

Pro Arg Ile Val Ser Phe Gly Tyr Gly Ala Cys Glu His Asn Leu Gly

1 5 10 15

Met Ser Leu Tyr Asp Arg Gln Gly Leu Gln Arg Gln

 20 25

<210> 4

<211> 21

<212> PRT

<213> Eimeria tenella

<400> 4

Glu Ser Gln Arg Ala Pro Met Val Ile Arg Tyr Gly Tyr Gly Ala Cys

1 5 10 15

Glu Tyr Asn Leu Gly

 20

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> Eimeria maxima

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(10)

<223> Eimeria maxima TRAP-1

<400> 5

Gly Gly Gly Phe Pro Thr Ala Ala Val Ala

1 5 10

<210> 6

<211> 40

<212> PRT

<213> Eimeria maxima

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> Eimeria maxima TRAP-02

<400> 6

Ala Ala Pro Glu Thr Pro Ala Val Gln Pro Lys Pro Glu Glu Gly His

1 5 10 15

Glu Arg Pro Glu Pro Glu Glu Glu Glu Lys Lys Glu Glu Gly Gly

 20 25 30

Gly Phe Pro Thr Ala Ala Val Ala

 35 40

<210> 7

<211> 40

<212> PRT

<213> Eimeria maxima

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(40)

<223> Eimeria maxima TRAP-03

<400> 7

Gly Gly Gly Phe Pro Thr Ala Ala Val Ala Gly Gly Val Gly Gly Val

1 5 10 15

Leu Leu Ile Ala Ala Val Gly Gly Gly Val Ala Ala Phe Thr Ser Gly

 20 25 30

Gly Gly Gly Ala Gly Ala Gln Glu

 35 40

<210> 8

<211> 70

<212> PRT

<213> Eimeria maxima

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(70)

<223> Eimeria maxima TRAP

<400> 8

Ala Ala Pro Glu Thr Pro Ala Val Gln Pro Lys Pro Glu Glu Gly His

1 5 10 15

Glu Arg Pro Glu Pro Glu Glu Glu Glu Lys Lys Glu Glu Gly Gly

 20 25 30

Gly Phe Pro Thr Ala Ala Val Ala Gly Gly Val Gly Gly Val Leu Leu

 35 40 45

Ile Ala Ala Val Gly Gly Gly Val Ala Ala Phe Thr Ser Gly Gly Gly

 50 55 60

Gly Ala Gly Ala Gln Glu

65 70

<210> 9

<211> 8

<212> PRT

<213> Avian Influenza

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(8)

<223> Avian Influenza virus m2e

<400> 9

Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn

1 5

<210> 10

<211> 8

<212> PRT

<213> Avian Influenza

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(8)

<223> Avian Influenza virus m2e

<400> 10

Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn

1 5

<210> 11

<211> 12

<212> PRT

<213> Avian Influenza

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(12)

<223> Avian Influenza virus HA5 UA

<400> 11

Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu Lys Ile Gln

1 5 10

<210> 12

<211> 19

<212> PRT

<213> Avian Influenza

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(19)

<223> Avian Influenza virus HA5 LB

<400> 12

Ala Asn Pro Ala Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asp Phe Asn Asp Tyr

1 5 10 15

Glu Glu Leu

<210> 13

<211> 16

<212> PRT

<213> Avian Influenza

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(16)

<223> Avian Influenza virus NP 54-69

<400> 13

Gly Arg Leu Ile Gln Asn Ser Ile Thr Ile Glu Arg Met Val Leu Ser

1 5 10 15

<210> 14

<211> 14

<212> PRT

<213> Avian Influenza

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(14)

<223> Avian Influenza virus NP 147-160

<400> 14

Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val Arg Thr Gly Met Asp

1 5 10

<210> 15

<211> 190

<212> PRT

<213> Gallus gallus

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(190)

<223> Chicken HMGB1 amino acid

<400> 15

Met Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr

1 5 10 15

Ala Phe Phe Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro

20 25 30

Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg

35 40 45

Trp Lys Thr Met Ser Ser Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala

50 55 60

Lys Ala Asp Lys Leu Arg Tyr Glu Lys Glu Met Lys Asn Tyr Val Pro

65 70 75 80

Pro Lys Gly Glu Thr Lys Lys Lys Phe Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys

85 90 95

Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu Phe Arg Pro Lys
 100 105 110
 Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Val Ala Lys Lys
 115 120 125
 Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala Ala Asp Asp Lys Gln Pro Tyr
 130 135 140

Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala
 145 150 155 160
 Ala Tyr Arg Ala Lys Gly Lys Val Asp Ala Gly Lys Lys Val Val Ala
 165 170 175
 Lys Ala Glu Lys Ser Lys Lys Lys Lys Glu Glu Glu Glu Asp
 180 185 190

<210> 16

<211> 85

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic: HMGB1 box al

<400> 16

Met Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr

1 5 10 15
 Ala Phe Phe Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro
 20 25 30
 Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg
 35 40 45
 Trp Lys Thr Met Ser Ser Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala
 50 55 60
 Lys Ala Asp Lys Leu Arg Tyr Glu Lys Glu Met Lys Asn Tyr Val Pro

65 70 75 80

Pro Lys Gly Glu Thr

85

<210> 17

<211> 54

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic: HMGB1 box a2

<400> 17

Pro Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu

1 5 10 15

Arg Trp Lys Thr Met Ser Ser Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met

 20 25 30

Ala Lys Ala Asp Lys Leu Arg Tyr Glu Lys Glu Met Lys Asn Tyr Val

 35 40 45

Pro Pro Lys Gly Glu Thr

50

<210> 18

<211> 73

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic: HMGB1 box b1

<400> 18

Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe

1 5 10 15

Cys Ser Glu Phe Arg Pro Lys Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser

 20 25 30

Ile Gly Asp Val Ala Lys Lys Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala

 35 40 45

Ala Asp Asp Lys Gln Pro Tyr Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu

50 55 60

Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala Ala Tyr

65 70

<210> 19

<211> 69

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic: HMGB1 box b2

<400> 19

Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu
 1 5 10 15

Phe Arg Pro Lys Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp
 20 25 30

Val Ala Lys Lys Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala Ala Asp Asp
 35 40 45

Lys Gln Pro Tyr Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu
 50 55 60

Lys Asp Ile Ala Ala

65

<210> 20

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220

><223> Synthetic: HMGB1 RAGE Binding domain

<400> 20

Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe
 1 5 10 15

Cys Ser Glu Phe Arg

20

<210> 21

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic: HMGB1 proinflammatory cytokine activity

<400> 21

Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala Ala Tyr Arg Ala Lys Gly
 1 5 10 15

Lys Val Asp Ala Gly Lys Lys Val Val Ala Lys Ala Glu Lys Ser Lys
 20 25 30

Lys

<210> 22

<211> 215

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(215)

<223> HMGB1

<400> 22

Met Gly Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr

1 5 10 15

Ala Phe Phe Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro

 20 25 30

Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg

 35 40 45

Trp Lys Thr Met Ser Ala Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala

 50 55 60

Lys Ala Asp Lys Ala Arg Tyr Glu Arg Glu Met Lys Thr Tyr Ile Pro

65 70 75 80

Pro Lys Gly Glu Thr Lys Lys Lys Phe Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys

 85 90 95

Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu Tyr Arg Pro Lys

 100 105 110

Ile Lys Gly Glu His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Val Ala Lys Lys

 115 120 125

Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn Thr Ala Ala Asp Asp Lys Gln Pro Tyr

 130 135 140

Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala

145 150 155 160

Ala Tyr Arg Ala Lys Gly Lys Pro Asp Ala Ala Lys Lys Gly Val Val

 165 170 175

Lys Ala Glu Lys Ser Lys Lys Lys Lys Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu

145 150 155 160
 Tyr Arg Ser Lys Gly Lys Val Gly Gly Gly Ala Ala Lys Ala Pro Ser
 165 170 175
 Lys Pro Asp Lys Ala Asn Asp Glu Asp Glu Asp Asp Asp Glu Glu Glu

 180 185 190
 Asp Glu Asp Asp Asp Asp Glu Glu Glu Glu Asp Asp Glu
 195 200 205
 <210> 24
 <211> 272
 <212> PRT
 <213> Gallus gallus
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(272)
 <223> CD154 chicken
 <400> 24
 Met Asn Glu Ala Tyr Ser Pro Ala Ala Pro Arg Pro Met Gly Ser Thr
 1 5 10 15
 Ser Pro Ser Thr Met Lys Met Phe Met Cys Phe Leu Ser Val Phe Met

 20 25 30
 Val Val Gln Thr Ile Gly Thr Val Leu Phe Cys Leu Tyr Leu His Met
 35 40 45
 Lys Met Asp Lys Met Glu Glu Val Leu Ser Leu Asn Glu Asp Tyr Ile
 50 55 60
 Phe Leu Arg Lys Val Gln Lys Cys Gln Thr Gly Glu Asp Gln Lys Ser
 65 70 75 80
 Thr Leu Leu Asp Cys Glu Lys Val Leu Lys Gly Phe Gln Asp Leu Gln

 85 90 95
 Cys Lys Asp Arg Thr Ala Ser Glu Glu Leu Pro Lys Phe Glu Met His
 100 105 110
 Arg Gly His Glu His Pro His Leu Lys Ser Arg Asn Glu Thr Ser Val
 115 120 125
 Ala Glu Glu Lys Arg Gln Pro Ile Ala Thr His Leu Ala Gly Val Lys

130 135 140
 Ser Asn Thr Thr Val Arg Val Leu Lys Trp Met Thr Thr Ser Tyr Ala
 145 150 155 160
 Pro Thr Ser Ser Leu Ile Ser Tyr His Glu Gly Lys Leu Lys Val Glu
 165 170 175
 Lys Ala Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ser Gln Val Ser Phe Cys Thr Lys
 180 185 190
 Ala Ala Ala Ser Ala Pro Phe Thr Leu Tyr Ile Tyr Leu Tyr Leu Pro
 195 200 205
 Met Glu Glu Asp Arg Leu Leu Met Lys Gly Leu Asp Thr His Ser Thr

210 215 220
 Ser Thr Ala Leu Cys Glu Leu Gln Ser Ile Arg Glu Gly Gly Val Phe
 225 230 235 240
 Glu Leu Arg Gln Gly Asp Met Val Phe Val Asn Val Thr Asp Ser Thr
 245 250 255
 Ala Val Asn Val Asn Pro Gly Asn Thr Tyr Phe Gly Met Phe Lys Leu
 260 265 270

<210> 25
 <211> 261
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(261)

<223> Human CD154

<400> 25

Met Ile Glu Thr Tyr Asn Gln Thr Ser Pro Arg Ser Ala Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Leu Pro Ile Ser Met Lys Ile Phe Met Tyr Leu Leu Thr Val Phe Leu
 20 25 30
 Ile Thr Gln Met Ile Gly Ser Ala Leu Phe Ala Val Tyr Leu His Arg
 35 40 45

Arg Leu Asp Lys Ile Glu Asp Glu Arg Asn Leu His Glu Asp Phe Val

50 55 60

Phe Met Lys Thr Ile Gln Arg Cys Asn Thr Gly Glu Arg Ser Leu Ser

65 70 75 80

Leu Leu Asn Cys Glu Glu Ile Lys Ser Gln Phe Glu Gly Phe Val Lys

85 90 95

Asp Ile Met Leu Asn Lys Glu Glu Thr Lys Lys Glu Asn Ser Phe Glu

100 105 110

Met Gln Lys Gly Asp Gln Asn Pro Gln Ile Ala Ala His Val Ile Ser

115 120 125

Glu Ala Ser Ser Lys Thr Thr Ser Val Leu Gln Trp Ala Glu Lys Gly

130 135 140

Tyr Tyr Thr Met Ser Asn Asn Leu Val Thr Leu Glu Asn Gly Lys Gln

145 150 155 160

Leu Thr Val Lys Arg Gln Gly Leu Tyr Tyr Ile Tyr Ala Gln Val Thr

165 170 175

Phe Cys Ser Asn Arg Glu Ala Ser Ser Gln Ala Pro Phe Ile Ala Ser

180 185 190

Leu Cys Leu Lys Ser Pro Gly Arg Phe Glu Arg Ile Leu Leu Arg Ala

195 200 205

Ala Asn Thr His Ser Ser Ala Lys Pro Cys Gly Gln Gln Ser Ile His

210 215 220

Leu Gly Gly Val Phe Glu Leu Gln Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn

225 230 235 240

Val Thr Asp Pro Ser Gln Val Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe

245 250 255

Gly Leu Leu Lys Leu

260

<210> 26

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(11)
 <223> Human CD154 peptide
 <400> 26
 Trp Ala Glu Lys Gly Tyr Tyr Thr Met Ser Cys
 1 5 10
 <210> 27
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Gallus gallus
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(11)
 <223> Chicken CD154 peptide
 <400> 27
 Trp Met Thr Thr Ser Tyr Ala Pro Thr Ser Ser

 1 5 10
 <210> 28
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Anas sp.
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(10)
 <223> Duck CD154 peptide
 <400> 28
 Trp Asn Lys Thr Ser Tyr Ala Pro Met Asn
 1 5 10
 <210> 29
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus sp.
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(10)
 <223> Mouse CD154 peptide

<400> 29

Trp Ala Lys Lys Gly Tyr Tyr Thr Met Lys

1 5 10

<210> 30

<211

> 10

<212> PRT

<213> Bos taurus

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(10)

<223> Cow CD154 peptide

<400> 30

Trp Ala Pro Lys Gly Tyr Tyr Thr Leu Ser

1 5 10

<210> 31

<211> 918

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic: TRAP MPP HMGB1 nucleotide sequence

<400> 31

```

ggatccatgg gcggtagcag cagaagcagc gcagcacctg aaacgagagc agtccagccg      60
aacctgaag aaggccatga aagacctgaa cctgaagaag aagaagagaa aaaagaagaa      120
ggcggcggct ttctacagc agcagtcgcg ggcggatcaa gcagatcttc cccttctcat      180

gatgcgcttg aaagcgaacg gacgcctcgg gttatctcct ttggttacgg tgcgtgcgaa      240
cataatctgg gcgtctctct ttttagacgc gaagaaacga aaaaagatcc gcgtggacgg      300
ggcggatcaa gcagatcttc catgggtaaa ggcgaccga aaaaacctcg gggcaaatg      360
tcaagctacg catttttctg ccaaacatgc agagaagaac ataagaaaa acatcctgat      420
gctagcgtaa acttttcaga atttagcaaa aatgttctg aacgttgaa aacgatgtct      480
tccaaagaaa agggtaaatt tgaagatatg gctaaagccg acaaattgcg gtacgaaaa      540
gaaatgaaaa actacgtacc gcctaaagga gaaacaaaga aaaaatttaa agatccgaac      600

gccctaaaa gaccgccttc tgcatttttc ctgttttctg ccgaatttcg cccgaaaatt      660
aaaggagaac atcctggctc gagcatcggc gacgttgca aaaaacttgg agaaatgtgg      720
aataacacgg cagcggatga caaacagccg tatgagaaaa aagctgcca attgaaagaa      780

```

aaatacgaag aagatatacgc agcgtaccgc gcaaaaggaa aagtggacgc gggtaaaaaa 840
 gttgtggcta aagcggaaaa atcaagaag aaaaaggaag aagaagaaga cggcggctca 900
 tctcggctct ccgacgtc 918

<210> 32

<211> 306

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic: TRAP MPP HMGB1 peptide

<400> 32

Gly Ser Met Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Ala Ala Pro Glu Thr Arg

1 5 10 15

Ala Val Gln Pro Lys Pro Glu Glu Gly His Glu Arg Pro Glu Pro Glu

20 25 30

Glu Glu Glu Glu Lys Lys Glu Glu Gly Gly Gly Phe Pro Thr Ala Ala

35 40 45

Val Ala Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Pro Ser His Asp Ala Pro Glu

50 55 60

Ser Glu Arg Thr Pro Arg Val Ile Ser Phe Gly Tyr Gly Ala Cys Glu

65 70 75 80

His Asn Leu Gly Val Ser Leu Phe Arg Arg Glu Glu Thr Lys Lys Asp

85 90 95

Pro Arg Gly Arg Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Met Gly Lys Gly Asp

100 105 110

Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr Ala Phe Phe Val Gln

115 120 125

Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro Asp Ala Ser Val Asn

130 135 140

Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg Trp Lys Thr Met Ser

145 150 155 160

Ser Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala Lys Ala Asp Lys Leu

165 170 175

Arg Tyr Glu Lys Glu Met Lys Asn Tyr Val Pro Pro Lys Gly Glu Thr

180 185 190

Lys Lys Lys Phe Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala

195 200 205

Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu Phe Arg Pro Lys Ile Lys Gly Glu His

210 215 220

Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Val Ala Lys Lys Leu Gly Glu Met Trp

225 230 235 240

Asn Asn Thr Ala Ala Asp Asp Lys Gln Pro Tyr Glu Lys Lys Ala Ala

245 250 255

Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala Ala Tyr Arg Ala Lys

260 265 270

Gly Lys Val Asp Ala Gly Lys Lys Val Val Ala Lys Ala Glu Lys Ser

275 280 285

Lys Lys Lys Lys Glu Glu Glu Glu Asp Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser

290 295 300

Asp Val

305

<210> 33

<211> 777

<

212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic: MPP HMGB1 nucleotide

<400> 33

ggatccatgg gcggtagcag cagaagcagc ctttctcatg atgcgcctga aagcgaacgg 60

acgcctcggg ttatctcctt tggttacggt gcgtgcgaac ataatctggg cgtctctctt 120

tttagacgcg aagaacgaa aaaagatccg cgtggacggg gcggatcaag cagatcttcc 180

atgggtaaag gcgaccgaa aaaactcgg ggcaaatgt caagctacgc atttttcgtc 240

caaacatgca gagaagaaca taagaaaaa catcctgatg ctagcgtaaa cttttcagaa 300

tttagcaaaa aatgttctga acgttggaag acgatgtctt ccaaagaaaa gggtaaattt 360

gaagatatgg ctaaagccga caaattgcgg tacgaaaaag aaatgaaaa ctacgtaccg 420

cctaaaggag aaacaaagaa aaaatttaaa gatccgaacg cccctaaaag accgccttct 480
 gcatttttcc tgttttgctc cgaatttcgc ccgaaaatta aaggagaaca tcttggtctg 540
 agcatcggcg acgttgcgaa aaaacttggga gaaatgtgga ataacacggc agcggatgac 600
 aaacagccgt atgagaaaaa agctgccaaa ttgaaagaaa aatacgaata agatatacga 660
 gcgtaccgcg caaaaggaaa agtggacgcg ggtaaaaaag ttgtggctaa agcggaaaaa 720
 tcaaagaaga aaaaggaaga agaagaagac ggcggctcat ctcggtcctc cgacgtc 777

<210> 34

<211> 259

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic: MPP HMGB1 peptide

<400> 34

Gly Ser Met Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Pro Ser His Asp Ala Pro

1 5 10 15

Glu Ser Glu Arg Thr Pro Arg Val Ile Ser Phe Gly Tyr Gly Ala Cys

20 25 30

Glu His Asn Leu Gly Val Ser Leu Phe Arg Arg Glu Glu Thr Lys Lys

35 40 45

Asp Pro Arg Gly Arg Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Met Gly Lys Gly

50 55 60

Asp Pro Lys Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr Ala Phe Phe Val

65 70 75 80

Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro Asp Ala Ser Val

85 90 95

Asn Phe Ser Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg Trp Lys Thr Met

100 105 110

Ser Ser Lys Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala Lys Ala Asp Lys

115 120 125

Leu Arg Tyr Glu Lys Glu Met Lys Asn Tyr Val Pro Pro Lys Gly Glu

130 135 140

Thr Lys Lys Lys Phe Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser

145 150 155 160

Ala Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu Phe Arg Pro Lys Ile Lys Gly Glu
 165 170 175

His Pro Gly Leu Ser Ile Gly Asp Val Ala Lys Lys Leu Gly Glu Met
 180 185 190

Trp Asn Asn Thr Ala Ala Asp Asp Lys Gln Pro Tyr Glu Lys Lys Ala
 195 200 205

Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala Ala Tyr Arg Ala
 210 215 220

Lys Gly Lys Val Asp Ala Gly Lys Lys Val Val Ala Lys Ala Glu Lys
 225 230 235 240

Ser Lys Lys Lys Lys Glu Glu Glu Glu Asp Gly Gly Ser Ser Arg Ser
 245 250 255

Ser Asp Val

<210> 35

<211> 768

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic: TRAP HMGB1 nucleotide sequence

<400> 35

ggatccatgg gcgtagcag cagaagcagc gcagcacctg aaacgagagc agtccagccg 60

aaacctgaag aaggccatga aagacctgaa cctgaagaag aagaagagaa aaaagaagaa 120

ggcggcggct ttctacagc agcagtcgcg ggcggatcaa gcagatcttc catgggtaaa 180

ggcgacccga aaaaacctcg gggcaaatg tcaagctacg catttttcgt ccaaaccatgc 240

agagaagaac ataagaaaa acatcctgat gctagcgtaa acttttcaga atttagcaaa 300

aatgttctg aacgttgaa aacgatgtct tcaaagaaa agggtaaatt tgaagatatg 360

gctaaagccg acaaatgagc gtacgaaaa gaaatgaaaa actacgtacc gcctaaagga 420

gaaacaaaga aaaaatttaa agatccgaac gccctaaaa gaccgccttc tgcatttttc 480

ctgttttctg ccgaatttcg cccgaaaatt aaaggagaac atcctggtct gagcatcggc 540

gacgttgcca aaaaacttgg agaaatgtgg aataaacacgg cagcggatga caaacagccg 600

tatgagaaaa aagctgccaa attgaaagaa aaatacgaag aagatcgc agcgtaccgc 660

```

gcaaaaggaa aagtggacgc gggtaaaaaa gttgtggcta aagcggaaaa atcaaagaag      720
aaaaaggaag aagaagaaga cggcggctca tctcggctct cgcacgtc                      768
<210> 36
<211> 256
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> Synthetic: TRAP HMGB1 peptide
<400> 36
Gly Ser Met Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Ala Ala Pro Glu Thr Arg
1           5           10           15
Ala Val Gln Pro Lys Pro Glu Glu Gly His Glu Arg Pro Glu Pro Glu
           20           25           30
Glu Glu Glu Glu Lys Lys Glu Glu Gly Gly Gly Phe Pro Thr Ala Ala
           35           40           45
Val Ala Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Met Gly Lys Gly Asp Pro Lys
           50           55           60
Lys Pro Arg Gly Lys Met Ser Ser Tyr Ala Phe Phe Val Gln Thr Cys
65           70           75           80
Arg Glu Glu His Lys Lys Lys His Pro Asp Ala Ser Val Asn Phe Ser
           85           90           95
Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg Trp Lys Thr Met Ser Ser Lys
           100          105          110
Glu Lys Gly Lys Phe Glu Asp Met Ala Lys Ala Asp Lys Leu Arg Tyr
           115          120          125
Glu Lys Glu Met Lys Asn Tyr Val Pro Pro Lys Gly Glu Thr Lys Lys
           130          135          140
Lys Phe Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys Arg Pro Pro Ser Ala Phe Phe
145          150          155          160
Leu Phe Cys Ser Glu Phe Arg Pro Lys Ile Lys Gly Glu His Pro Gly
           165          170          175
Leu Ser Ile Gly Asp Val Ala Lys Lys Leu Gly Glu Met Trp Asn Asn
           180          185          190

```

Thr Ala Ala Asp Asp Lys Gln Pro Tyr Glu Lys Lys Ala Ala Lys Leu
 195 200 205

Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Ile Ala Ala Tyr Arg Ala Lys Gly Lys
 210 215 220

Val Asp Ala Gly Lys Lys Val Val Ala Lys Ala Glu Lys Ser Lys Lys
 225 230 235 240

Lys Lys Glu Glu Glu Glu Asp Gly Gly Ser Ser Arg Ser Ser Asp Val
 245 250 255

<210> 37

<211> 32

<212> PRT

<213> Toxoplasma gondii

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(32)

<223> Toxoplasma gondii RH

<400> 37

Pro Arg Val Ile Ser Phe Gly Tyr Gly Ala Cys Glu His Asn Leu Gly

1 5 10 15

Val Ser Leu Phe Arg Arg Glu Glu Thr Lys Lys Asp Pro Arg Gly Arg
 20 25 30

<210> 38

<211> 43

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic: Consensus sequence

<220><221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> Xaa can be any amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (13)..(17)

<223> Xaa can be any amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (24)..(24)

<223> Xaa can be any amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (28)..(28)

<223> Xaa can be any amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (31)..(32)

<223> Xaa can be any amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (35)..(39)

<223> Xaa can be any amino acid

<400> 38

Pro Ser His Asp Ala Pro Glu Ser Glx Arg Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5 10 15

Xaa Gly Tyr Gly Ala Cys Glu Xaa Asn Leu Gly Xaa Ser Leu Xaa Xaa

 20 25 30

Arg Glx Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Arg Gly Arg

 35 40

<210> 39

<211> 841

<212> PRT

<213> Toxoplasma gondii

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(841)

<223> Toxoplasma gondii ROM5

<400> 39

Met Ser Ser Lys Gly Gly Ser Ser Arg Leu Gly Ser Lys Asp Leu Lys

1 5 10 15

Lys Met Thr Ser Arg Thr Glu Arg Glu Leu Arg Asp Ser Gly Arg Val

 20 25 30

Arg Gly Glu Val Glu Arg Val Glu Lys Arg Leu Arg Ala Thr Ala Lys

 35 40 45

Val Lys Glu Gln Pro Pro Thr Gly Asp Tyr Lys Arg Arg Ala Leu Ala
 50 55 60
 Ser Pro Gly Glu Thr Ala Ala Pro Thr Phe Leu Val Asp Ser Arg Gly
 65 70 75 80
 Ile Pro Arg Lys Thr Ser Ser Thr Ala Pro Arg Lys Ala Thr Leu Arg
 85 90 95

 Pro Ala Ser Ser Ser Pro Arg Leu Ala Ser Ser Ser Arg Pro Thr Glu
 100 105 110
 Ser Thr Leu Pro Ser Ser Ser Ser Arg Ala Leu Gln Gly Ala Ser Ser
 115 120 125
 Ser Ser Ser Ser Arg Pro Arg Arg Leu His Glu Ser Ala Ser Gly Arg
 130 135 140
 Gly Gly Ser Gly Gly Ser Ala Gly Glu Leu Arg Gln Glu Lys Lys Arg
 145 150 155 160

 Leu Pro Glu Leu Glu Ala Ala Glu Ala Ala Pro Ala Ser Cys Val Val
 165 170 175
 Glu Leu Arg Asp Val Thr Ala Arg Lys Gly Arg Thr Ser Pro Ala Thr
 180 185 190
 Pro Pro Glu Thr Ala Gly Ser Ser Val Cys Gly Gln Gly Ser His Ala
 195 200 205
 Arg Thr Ala Glu Lys Leu Glu Glu Gly Thr Ala Ser His Arg Asp Gly
 210 215 220

 Ser Arg Arg Gly Ser Val Asp Ala Glu Thr Trp Ala Thr Pro Gly Asp
 225 230 235 240
 Gly Ser Ser Ser His Glu Phe Glu Ser Ser Pro Gln Arg Glu Glu Arg
 245 250 255
 Met Gln Pro Gln Glu Thr Gly Arg Arg Glu Leu Ser Ser Glu Pro Arg
 260 265 270
 Ser Gly Asp Leu Thr Lys Asn Gly Gly Asp Gly Gly Pro Arg Arg His
 275 280 285

 Ser Cys Ala Trp Arg Lys Trp Arg Glu His Met Ile Gln Ser Phe Asp

Ser Ile Glu Tyr Trp Asp His Ile Ala Ser Pro Ala Trp Phe Leu Phe
 545 550 555 560
 Cys Val Ser Val Leu Val Met Val Ala Gln Phe Gly Asn Met Val Gly
 565 570 575
 Val Gln Gly Val Asp Asn Asn Ala His Leu Gly Gly Leu Ile Gly Gly
 580 585 590
 Leu Leu Phe Gly Phe Ala Thr Ile Arg Ser Val His Ala Phe Arg Trp
 595 600 605

 Gln Gly Val Ala Glu Arg Met Ala Ser Ser Thr Leu Phe Trp Trp Met
 610 615 620
 Phe Pro Ala Glu Lys Arg Arg Ser Leu Arg Glu Asp Asn Leu Gln Arg
 625 630 635 640
 Val Ala Arg Glu Arg Glu Glu Arg Ser Ser Gly Arg Ile Pro Pro Pro
 645 650 655
 Lys Phe Val Trp Lys Phe Arg Gly His Glu Arg Glu Trp Cys Val Arg
 660 665 670

 Phe Ala Ala Ala Val Gly Leu Val Thr Phe Trp Ser Val Leu Trp Leu
 675 680 685
 Tyr Leu Leu Val Pro Ser Tyr Tyr Glu Ser Leu Ser Ser Pro Pro Gly
 690 695 700
 Asn Phe Ser Phe Leu Gly Ser Thr Gly Cys His Cys Cys Arg Val Gln
 705 710 715 720
 Pro Phe Pro Gly Glu Glu Asp Lys Leu Pro Ala Phe His Pro Val Arg
 725 730 735

 Val Asn Arg Gly Leu Phe Trp Cys Phe Val Ser Glu Gly Val Ala Asn
 740 745 750
 Leu Phe Cys Gly Arg Ser Ser Ala Leu Asn Arg Gly Ala Asp Val Tyr
 755 760 765
 Gly Gln Thr Arg Gln Phe Glu Glu Ala Leu Gly Asp Leu Pro Ser Ala
 770 775 780
 Arg Ala Gly Glu Ala Pro Leu Arg Ile Ala Lys Glu Glu Gly Glu Ser

